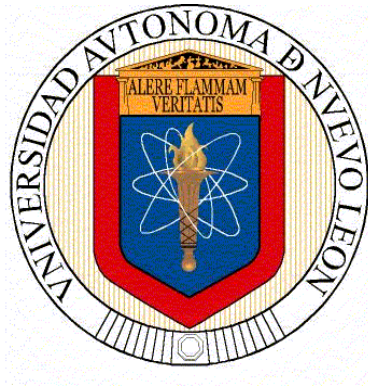


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.



ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA MUERTE INDUCIDA POR  
DOS EXTRACTOS RICOS EN POLIFENOLES PROVENIENTES DE *Opuntia*  
*ficus-indica* EN CÁNCER DE COLON.

Por:

María Norma González Flores.

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con  
Orientación en Inmunobiología.

Diciembre, 2020.

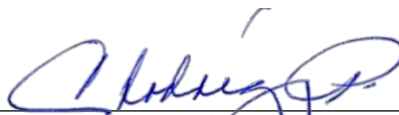
Estudio de la inmunogenicidad de la muerte inducida por dos extractos ricos en polifenoles  
provenientes de *Opuntia ficus-indica* en cáncer de colon.

Comité de tesis.



---

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres.**



---

**Dra. María Cristina Rodríguez Padilla.**  
Secretario



---

**Dra. Diana Elia Caballero Hernández.**  
Vocal 1



---

**Dra. Diana Ginette Zárate Triviño.**  
Vocal 2



---

**Dr. José Manuel Vázquez Guillen.**  
Vocal 3

Estudio de la inmunogenicidad de la muerte inducida por dos extractos ricos en polifenoles  
provenientes de *Opuntia ficus-indica* en cáncer de colon.

Dirección de Tesis



---

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres.**  
Director.



---

**Dra Marilena Antunes-Ricardo.**  
Director externo.

AGRADECIMIENTOS.



Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Inmunología y Virología por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mis papas, por su apoyo en todo momento. Gracias, mamá por motivarme y por obligarme a hacer las cosas, aún cuando sentía que no podía ni con mi alma. Gracias, papá, porque además de tu apoyo emocional, siempre estuviste al pendiente que no me faltara nada. Porque entendieron mis momentos de ausencia en reuniones familiares, porque soportaron mi mal humor a causa del cansancio, por secar esas lagrimas en momentos de estrés y de tensión. Pero sobretodo, muchas gracias por no dejarme sola en este proceso, porque estuvieron detrás de mí viéndome salir de mi zona de confort y enfrentarme a nuevos retos, por no limitarme y por motivarme cuando sentía que no podía más. Los amo infinitamente.

Gracias a Matías, mi hermano, y a Daniela, que más que una cuñada, es una hermana y amiga. Matías, gracias por esos consejos tan certeros, por escucharme. Agradezco infinitamente que a lo largo de mi vida estuvieras cuidándome y dándome el ejemplo de luchar por lo que uno quiere, a pesar de los sacrificios. Gracias por fomentar en mí el cuestionarme de todo. Daniela, no tengo las palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho por mí, principalmente estos dos años de maestría. Gracias por siempre mostrar interés hacia lo que hago, por preguntarme las cosas, y por valorar mi trabajo y entender mis ausencias. Estoy infinitamente agradecida contigo por escucharme, aconsejarme, y siempre darme ánimos en los momentos que era necesario.

Gracias a *mi manito* Alejandro y a Nane. Ale, gracias por tu motivación, por entender mi ausencia y apoyarme siempre en todo. Con tu ejemplo de perseverancia...

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme entrar de voluntaria al laboratorio, por apoyarme cuando recién me involucraba en el área de investigación, y por permitirme realizar mi proyecto dentro del LIV. A los doctores que forman parte de mi comité de tesis, Dra. Diana Caballero, gracias por esas pláticas interesantes en su laboratorio, por las coquitas cuando andaba estresada y cansada, por sus sabios consejos y recomendaciones. Al Dr. José Manuel, por hacer los momentos más amenos en el lab, por esas risas interminables en el comedor (me saluda al cucaracho :P) y por alimentarme cuando no había bequita. Gracias a la Dra. Diana Zarate, por su disposición cuando necesité ayuda durante el desarrollo de mi proyecto.

Dra Marilena

Muchas gracias a la Dra. Ana Carolina Martínez, “*la doc*” pa’ la raza. No tengo palabras suficientes para agradecerle todo este proceso, que se, fue un reto para ambas. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio cuando recién llegué al LIV, por permitirme aprender de usted y de sus estudiantes, y por darme la oportunidad de realizar la maestría bajo su tutela. Estoy eternamente agradecida con usted por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollarme como investigadora, por la paciencia todo este tiempo.

Los guapos del L-14

Compañeros de maestría.

Familia y amigos.

*A ti, mami, por retarme e impulsarme a darlo todo cada día. Por tu ejemplo de constancia y dedicación.*

*A pipapi, por tu eterno amor, apoyo, comprensión y buenos consejos.  
Sin ustedes no habría llegado hasta aquí.*

*A Matías y Alejandro, por su apoyo, motivación en los días difíciles y ejemplo de convicción y perseverancia.  
Los amo con el alma entera.*

*En dedicatoria a todas aquellas personas que perdieron la batalla contra el cáncer, en especial  
a mis abuelos, Manuel y Lupita.*

## INDICE

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. ANTECEDENTES .....	3
3.1 Cáncer .....	3
3.1.2 Cáncer de colon.....	3
3.2 Muerte celular. ....	9
3.2.1 Muerte celular inmunogénica. ....	12
3.2.1.1 Papel de los DAMPs en la inmunogenicidad de la muerte. ....	13
3.3 Polifenoles.....	19
3.3.2 <i>Opuntia ficus-indica</i> .....	20
3.4 Polifenoles presentes en <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	22
3.4.1 Efecto biológico de los polifenoles presentes en <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	23
3.4.2 Método de obtención de polifenoles presentes en <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	29
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVO .....	31
6.1 Objetivos específicos. ....	31
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
7.1 Preparación del extracto de OFI .....	32
7.1.1 Preparación del extracto mediante hidrólisis alcalina.....	32
7.1.2 Extracción metanólica.....	32
7.1.3 Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	33
7.1.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD .....	33
7.1.5 Identificación de los compuestos fenólicos por LC/MSD-TOF .....	34
7.2 Ensayos in vitro.....	34
7.2.1 Mantenimiento de las líneas celulares. ....	34
7.2.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....	35
7.2.4 Ensayos de viabilidad celular por MTT.....	36
7.2.5 Ensayos de viabilidad celular con Calcein-AM por citometría de flujo.....	36
7.2.6 Ensayos de la exposición de calreticulina.....	37
7.2.7 Ensayos de liberación de ATP. ....	37
7.2.8 Ensayos de liberación de HMGB1.....	38
7.3 Ensayos in vivo.....	38
7.3.1 Material animal. ....	38
7.3.2 Establecimiento tumoral. ....	38
7.3.3 Vacunación profiláctica. ....	39

7.3.4 Obtención del índice tumoral.....	39
7.3.5 Evaluación de la sobrevida de los ratones. ....	39
7.4 Análisis estadístico.....	39
8. <i>RESULTADOS</i> .....	41
8.1 Cuantificación de fenoles totales presentes en los dos extractos ricos en polifenoles de OFI. .....	41
8.2 Obtención, cuantificación y caracterización por espectrometría de masas [LC/MCD-TOF] de los compuestos fenólicos presentes en OFI por dos métodos de extracción.....	41
8.3 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen pérdida de la viabilidad celular en Caco-2, CT-26 y HT-29 sin afectar a PBMC. ....	45
8.4 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen exposición de CALR en la línea celular CT-26. ....	49
8.5 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen liberación de ATP en la línea celular CT-26 .....	50
8.6 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI no inducen liberación de HMGB1 en la línea celular CT-26. ....	51
8.7 La vacunación profiláctica de células muertas con OFIm previene el establecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c.....	52
9. <i>DISCUSIÓN</i> .....	53
9.1 Cuantificación de fenoles totales presentes en los dos extractos ricos en polifenoles de OFI a través del método Folin-Ciocalteu. ....	53
9.2, Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos presentes en OFI por dos métodos de extracción.....	54
9.3 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen pérdida de la viabilidad celular en Caco-2, CT-26 y HT-29.....	55
9.4 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen la liberación y exposición de DAMPs. ....	55
9.5 La vacunación profiláctica de células muertas con OFIm previene el establecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c.....	57
10. <i>CONCLUSION</i> .....	59
11. <i>PERSPECTIVAS</i> . ....	60
12. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	61
13. <i>RESUMEN BIBLIOGRÁFICO</i> .....	73



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de muerte celular regulada .....	10
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	20
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de polifenoles por método de Folin Ciocalteu.....	41
<b>Tabla 4.</b> Cuantificación e identificación de los polifenoles presentes en ambos extractos de <i>O. ficus-indica</i> [OFI].....	44

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación anatómica del colon .....	3
<b>Figura 2.</b> Factores principales involucrados en el mecanismo de muerte celular inmunogénica. ....	12
<b>Figura 3.</b> Tipos de inductores de muerte celular inmunogénica. ....	15
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los Glucósidos cardiacos. ....	16
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la Hipericina. ....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la Shikonina. ....	17
<b>Figura 7.</b> Estructura química de Wogonin. ....	18
<b>Figura 8.</b> Resumen simplificado de la vía biosintética los polifenoles de manera general. ....	19
<b>Figura 9.</b> Perfil de cromatografía líquida de alta resolución de los extractos alcalino (azul) y metanólico (verde) de <i>Opuntia ficus-indica</i> a diferentes longitudes de onda. ....	43
<b>Figura 10.</b> El tratamiento con OFIa y OFIm reduce la viabilidad celular en líneas CRC y PBMCs. ....	46
<b>Figura 11.</b> El tratamiento con OFIa y OFIm reduce la viabilidad celular en líneas CRC. ....	48
<b>Figura 12.</b> El tratamiento con el IC <sub>50</sub> e IC <sub>100</sub> de OFIm induce la liberación de CALR en CRC. ....	49
<b>Figura 13.</b> El tratamiento con el IC <sub>50</sub> de OFIa y OFIm induce la liberación de ATP en CRC. ..	50
<b>Figura 14.</b> El tratamiento con el IC <sub>50</sub> e IC <sub>100</sub> de OFIa y OFIm no induce la liberación de HMGB1 en CRC. ....	51
<b>Figura 15.</b> OFIm induce memoria inmunológica a corto plazo a través de la vacunación profiláctica. ....	68

## ABREVIATURAS

CRC: cáncer colorectal.

OFI: *Opuntia ficus-indica*.

CMS: consensus molecular subtype.

TILs: linfocitos infiltrantes a tumor

ICR: constante inmunológica de rechazo

VEGF: factor de crecimiento endothelial vascular

HTA: hipertensión arterial

EGFR: receptor de crecimiento epidérmico

PD-1: programmed cell death protein 1

CTLA-4: cytotoxic y lymphocyte associated antigen 4

MC: muerte celular

MCR: muerte celular regulada

NCD: comité de nomenclatura de muerte celular

MCI: muerte celular inmunogenica

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño (por sus siglas en inglés; *Damage-associated molecular patterns*)

CALR: calreticulina

ATP: adenosin trifosfato

HMGB1: proteínas de grupo 1 de alta movilidad

ANXA1: anexina a 1

HSP-70: proteína de choque térmico 70

HSP-90: proteína de choque térmico 90.

RE: reticulo endoplasmático

GC: glicósidos cardiacos

IG: glicósidos de isorhamnetina

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés; *peripheral blood mononuclear cells*).

GPX4: Glutation peroxidasa 4.

MLKL: Proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto (por sus siglas en inglés; *Mixed lineage kinase domain-like protein*)

RIPK1: *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (por sus siglas en inglés)

RIPK3: *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* (por sus siglas en inglés).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés; *Reactive oxygen species*).

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos (por sus siglas en inglés; *Neutrophil extracellular trap*).

LAMP-1: Proteína de membrana asociada a lisosomas 1

ROCK1: Proteín-kinasa asociada a Rho 1

PANAX:

P2X7: Purinoreceptor P2X 7

TLR: Receptores de tipo Toll (por sus siglas en inglés; *Toll-like receptors*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés; *Deoxyribonucleic acid*).

EIF2 $\alpha$ : Factor de iniciación eucariota 2 (por sus siglas en inglés; *eukaryotic initiation factor 2*)

## 1. RESUMEN

*Opuntia ficus-indica* (OFI), comúnmente conocido como nopal, es una planta de origen mexicano rica en compuestos bioactivos, principalmente antioxidantes, que se ha reportado tienen diversas funciones benéficas en el organismo, que van desde la prevención y/o tratamiento de la obesidad, efectos anti-inflamatorios, y preventivos de enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, metabólicas, y recientemente se han estudiado sus efectos sobre células cancerosas. Uno de los grupos de compuestos con mayor presencia en el nopal son los polifenoles, los cuales se definen como metabolitos secundarios de las plantas, cuya estructura base está conformada por anillos de benceno con iones hidroxilo unidos. Se ha reportado que los polifenoles presentes en OFI tienen efecto citotóxico y la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon. Sin embargo, es necesario indagar en los efectos citotóxicos sobre las células cancerosas de dichos compuestos, así como el rol que juega el sistema inmune en la citotoxicidad inducida por los mismos, y determinar si las dosis en las que funcionan atacando el tumor no tienen efecto alguno sobre células del sistema inmune. Además, se desconoce el efecto anti-tumoral del tratamiento en ratones inmunocompetentes portadores de tumor. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si los extractos ricos en polifenoles presentes en OFI inducen citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en líneas celulares de cáncer de colon humano (Caco-2 y HT-29) y murino (CT-26), así como el rol que juega el sistema inmunológico en este mecanismo de muerte y su efecto *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, este trabajo buscó comparar los métodos de extracción comúnmente utilizados, y si este, afecta en la inmunogenicidad de la muerte.

## 2. ABSTRACT

*Opuntia ficus-indica* (OFI) commonly known as nopal, is a plant of Mexican origin that is rich in bioactive compounds, mainly antioxidants, which have been reported to have various beneficial functions in the body, ranging from the prevention and / or treatment of obesity, autoimmune, cardiovascular and metabolic diseases. More recently it has been shown that it possesses cytotoxic effects on tumor cells. Polyphenols are the most abundant compounds present with the greatest presence in the cactus. These are defined as secondary metabolites of plants, whose base structure is made up of benzene rings with attached hydroxyl ions. It has been reported that they polyphenols present in OFI have cytotoxic effects and the ability to induce apoptosis in colon cancer cells. However, it is necessary to investigate the effects of these compounds, and to determine if the doses in which they work by attacking the tumor have no effect on cells of the immune system. Furthermore, the anti-tumor effect of treatment in tumor-bearing immunocompetent mice is unknown. Therefore, the objective of this work was to determine if the polyphenols-rich extracts present in OFI induce cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in human colon cancer cell lines (Caco-2 and HT-29) and murine (CT -26), as well as the role that the immune system plays in this death mechanism and its effect in vitro and in vivo. Finally, this work sought to compare the commonly used extraction methods, and whether this affects the immunogenicity of death.

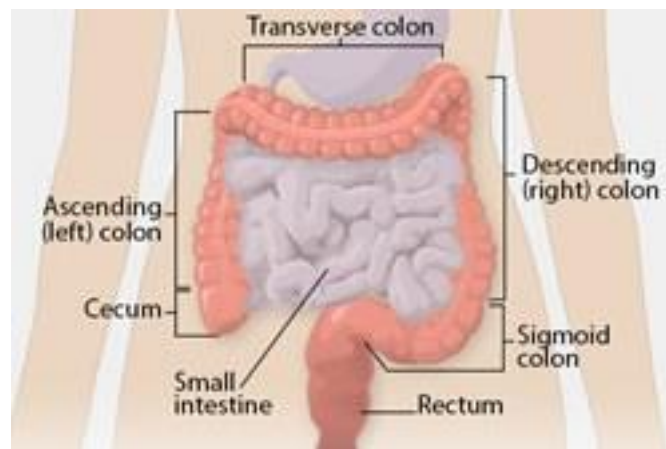
### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 *Cáncer*

El cáncer se define como un término genérico para un gran grupo de enfermedades que puede afectar casi cualquier parte del cuerpo y se caracteriza por el crecimiento de células anormales más allá de sus límites habituales y que además tiene la capacidad de invadir partes adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos (World Health Organization, 2018). A la fecha, es considerado la segunda causa de muerte a nivel mundial, reportándose 9.6 millones de muertes asociadas a cáncer en 2018. Dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia se encuentran pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago (GLOBACAN, 2018).

#### 3.1.2 Cáncer de colon.

El cáncer de colon (CRC), o colorrectal, incluye cualquier tipo de neoplasia de colon, recto y apéndice; el cual se caracteriza por la aparición de pólipos dentro de los órganos mencionados (NIH, 2019). A la fecha, CRC se encuentra en el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y como el segundo más agresivo en cuestiones de muerte, representando, en 2018, 1 de cada 10 casos de cáncer y muertes (GLOBACAN, 2018; Singh, Rai, Pandey, Singh & Sirvastava, 2019).



**Figura 1.** Clasificación anatómica del colon (CDC, 2020).

Los factores de riesgo para la aparición de CRC, tanto ambientales como genéticos, son los siguientes:

- a) Antecedentes heredofamiliares: 15-20% de los pacientes con CRC presentan antecedentes de enfermedades relacionadas con el colon, como enfermedades inflamatorias intestinales, reflujo, etc.
- b) Consumo de alcohol y tabaco: un consumo moderado aumenta en un 20% el riesgo de aparición de CRC, mientras que el consumo crónico eleva el riesgo hasta en un 50%.
- c) Aumento de peso: el aumento de peso relacionado con un aumento en el % de grasa corporal, así como la presencia de enfermedades asociadas al estilo de vida, como la diabetes mellitus tipo 2, se ha convertido de uno de los principales factores de riesgo para la aparición de CRC en edades tempranas (Kuipers et al., 2015).

#### 3.1.2.1 Tipos moleculares de CRC.

El desarrollo de CRC podría relacionarse con eventos genéticos como mutaciones y modificaciones epigenéticas que participan o se relacionan en la transformación de células sanas para el desarrollo del tumor.

En este sentido, las inestabilidades en el genoma se identifican como una característica molecular central que conduce a la acumulación de otras aberraciones genéticas potencialmente responsables de la aparición de CRC (Singh, Rai, Pandey, Singh & Sirvastava, 2019). A la fecha, son 3 tipos de inestabilidades genómicas las mayormente descritas para el desarrollo y progresión de CRC:

- Vía CIN: representa alrededor del 85% de los tumores en este órgano y se caracteriza principalmente por la pérdida de los genes supresores de tumor APC.
- Vía MSI: se caracteriza por alteraciones en microsatélites sin alterar la estructura o cambios numéricos en el genoma; esta vía se presenta en aproximadamente el 15% del total de los tumores en colon. Las principales mutaciones en esta vía se presentan en el sistema de reparación de errores de apareamiento (MMR) o inactivación somática por hipermetilaciones del promotor en el gen MLH1.



- Vía CIMP: mejor conocido como el fenotipo metilador de islas CpG, representa aproximadamente el 20-30% del total de CRC, predominando en mujeres; de los cuales, un 30 a 40% se desarrollan en la zona proximal del colon, mientras que el resto se caracterizan por aparecer en la parte distal de dicho órgano. Los tumores dentro de esta clasificación tienen una etiología diferente, así como características moleculares y epigenéticas variables. Se consideran tumores CIMP + cuando se encuentran mutaciones en los siguientes 5 genes: CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1. Sin embargo, existen 3 subgrupos dentro de esta vía: CIMP1, CIMP2 y CIMP negativo. CIMP1 se correlaciona con mutaciones en los genes BRAF y son MSI-high; por otra parte, CIMP2 presenta mutaciones en KRAS pero no en TP53 y BRAF (Singh, Rai, Pandey, Singh & Srivastava, 2019).

A lo largo del tiempo se han presentado diferentes clasificaciones de CRC, dividiéndolo en un variable número de subgrupos; dentro de estas clasificaciones, la más detallada y reciente se llevó a cabo en 2013, en donde se determinaron en 6 subtipos moleculares al CRC:

- C1: representa 21% del total de los tumores y se caracteriza por mutaciones en KRAS, TP53, además de ser CIN +.
- C2: se caracteriza por un alta en la expresión de los genes MMR, CIMP +, con mutaciones en BRAF y supresión en la vía WNT. Se caracteriza por la implicación del sistema inmune para el mantenimiento del tumor y una alta tasa proliferativa.
- C3: este subtipo es CIMP +, con mutaciones en KRAS.
- C4: tienden a ser tumores CIN y CIMP +, con mutaciones frecuentes en KRAS, BRAF y TP53. Es el subtipo molecular de CRC menos común.
- C5: se caracterizan por ser tumores CIN +, con mutaciones KRAS y TP53, así como una sobreexpresión en la vía WNT. Es el tipo de tumores con mayor recurrencia.
- C6: es un tipo de tumor que se identifica por su semejanza con las células sanas del colon, sin presentar mutaciones en KRAS ni BRAF. Tienden a ser resistentes a la muerte celular inducida por las terapias convencionales, con altas tasas proliferativas (Marisa et al., 2013).

Sin embargo, pese a las diversas clasificaciones que se han descrito para CRC, estas tienden a estar sesgadas en base al criterio del investigador, es por lo que era necesario establecer un “gold

standard” que permite normalizar las semejanzas y diferencias entre cada una de las clasificaciones previas. En este sentido, en 2015 se organizó al CRC en 4 subtipos moleculares, denominados “*consensus molecular subtypes (CMS)*”, que engloban subtipos previos y consideran cambios epigenéticos, genéticos y en altas/bajas en vías de señalización, así como el rol del sistema inmunológico y las terapias más efectivas.

### 3.1.2.2 Clasificación inmunogénica de CRC.

CMS, por sus siglas en inglés, es una clasificación completa del CRC que engloba los componentes del microambiente tumoral y las inestabilidades en los microsatélites de las células cancerosas.

Además, es importante mencionar el impacto del sistema inmune en la progresión del tumor; por una parte, pueden tener efecto supresor y controlar el crecimiento de este durante la inmunovigilancia. Por otra parte, la progresión del tumor puede generar inflamación crónica que se caracteriza por infiltración de células del sistema inmune que anulan las respuestas inmunes adaptativas, además de estimular la proliferación y supervivencia de las células tumorales, promoviendo la angiogénesis y metástasis. En este sentido, las clasificaciones basadas en características inmunológicas se han convertido en herramientas prometedoras para el pronóstico y tratamiento convencional como quimioterapias, radioterapias e inmunoterapias. Los subtipos son los siguientes:

**CMS1** muestra una regulación positiva asociada con la regulación de moléculas del punto de control inmunitario, se caracteriza por infiltración de TILs (linfocitos infiltrantes a tumor).

**CMS2 y CMS3** son fenotipos “inmunológicamente pobres”, se caracterizan por un microambiente sin TILs y una expresión mínima de la activación del complemento y baja angiogénesis.

**CMS4** tiene una orientación definida por la expresión de genes ICR (constante inmunológica de rechazo), lo cual se asocia con un fenotipo inmune inflamado y desfavorable, caracterizado por señalización de TGF- $\beta$ , activación del complemento y aumento en la angiogénesis. Su microambiente se caracteriza por la presencia de TILs y de fibroblastos asociados a cáncer.

### 3.1.2.2 Tratamientos para el cáncer de colon.

A la fecha, la cirugía sigue siendo la terapia de primera mano para el tratamiento de cáncer de colon (American Cancer Society, 2020), acompañada de quimioterapias como tratamiento adyuvante.

Además de la cirugía, existen otras opciones terapéuticas, elegidas en base al estadio clínico del tumor, siendo las más comunes las quimioterapias, las terapias dirigidas, y las inmunoterapias.

#### 3.1.2.3.1 Quimioterapias

Se administra por ciclos de 2 a 4 semanas, con un mínimo de 5 ciclos. Tiende a ser un tratamiento sistémico (administración oral o intravenosa), o en la zona donde se encuentra el tumor.

Las quimioterapias comúnmente utilizadas son fluoracilo, capecitabina, irinotecan, oxaliplatino y trifluridina. Las cuales se eligen en base al estadio en que se encuentra el tumor.

En estadios tempranos, como etapa 2, se implementan 5-fluoracilo (5-FU), leucovorin, oxaliplatino, y capecitabina. En etapa 3 se realizan poliquimioterapias, siendo la más utilizadas FOLFOX (5-FU, leucovorín, y oxaliplatino) o CAPEOX (capecitabina y oxaliplatino). Cuando el tumor se encuentra en estadios finales, se aplican las quimioterapias en combinación, acompañadas de terapias dirigidas, las cuales se mencionarán más adelante. Las terapias comúnmente utilizadas, además de FOLFOX y CAPEOX, son FOLFIRI (leucovorín, 5-FU, e irinotecán), FOLFOXIRI (leucovorín, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán) (American Cancer Society, 2017).

#### 3.1.2.3.2 Terapias dirigidas.

Se utilizan en etapas finales de CRC, cuando se presenta resistencia a las terapias convencionales o en combinación con quimioterapias, cuando se presenta una baja efectividad. A la fecha, las aprobadas para el tratamiento de CRC son las siguientes:

Las terapias dirigidas hacia el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cuya función principal radica en la formación de nuevos vasos sanguíneos para obtener nutrientes del medio. Por lo tanto, el objetivo principal de este tipo de terapias es inhibir la función de VEGF para limitar el crecimiento tumoral. Generalmente se aplican por vía intravenosa en combinación con las quimioterapias y los utilizados son bevacizumab, ramucirumab y ziv-aflibercept. Los principales

efectos secundarios reportados son HTA (hipertensión arterial), sangrados masivos, recuentos bajos de glóbulos blancos (Weight, Beaty & Ternent, 2017).

Las terapias dirigidas hacia el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual se encuentra sobre expresado en las células cancerosas, y su principal función es propiciar el crecimiento de estas. La principal desventaja de las terapias dirigidas hacia EGFR es su baja efectividad en tumores con mutaciones en KRAS, NRAS o BRAF. La aplicación es por vía intravenosa en combiación con quimioterapias y los más utilizados son cetuximab y panitumumab. Los principales efectos secundarios son problemas cutáneos, fatiga y dolores de cabeza (Lockhart & Berlin, 2005; American Cancer Society, 2017).

En estadios finales del cáncer se implementa otro tipo de terapia, regorafenib, un inhibidor de cinasas que impide el crecimiento del tumor y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Wright, Beaty & Ternent, 2017).

#### 3.1.2.3.3 Inmunoterapias.

El objetivo principal de las inmunoterapias es mejorar la respuesta inmune anti-tumoral, favoreciendo su erradicación. Estas terapias se utilizan en estadios avanzados o finales de CRC. Las principales inmunoterapias contra CRC son los inhibidores de PD-1 y los inhibidores de CTLA-4, los cuales se describirán a continuación.

Los inhibidores de PD-1 (*programmed cell death protein 1*; CD279) bloquean a PD-1, la cual es una proteína que se encuentra en la superficie celular de los linfocitos T y al ser bloqueada promueve la respuesta del sistema inmune en contra de las células cancerosas (Syn, Teng, Mok & Soo, 2017). Los de uso común son pembrolizumab (Keytruda) y nivolumab (Opdivo), se aplican de forma intravenosa y los principales efectos secundarios reportados son cansancio, tos, náuseas, comezón, sarpullido en la piel, estreñimiento, y dolores de articulaciones.

Los inhibidores de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*; CD152), el cual es un receptor de proteínas que regulan de manera negativa la respuesta inmune. Generalmente, se encuentran sobre-expresadas en linfocitos T reguladores, pero solo se regula al alza en linfocitos

Tras su activación, fenómeno observado en diferentes tipos de cáncer (Syn, Teng, Mok & Soo, 2017; Topalian, Taube, Anders & Pardoll, 2016). Para el tratamiento de CRC se utiliza en combinación con nivolumab (inhibidor de PD-1) de forma intravenosa (American Cancer Society, 2017). El de uso común es ipilimumab (Yervoy) y los principales efectos secundarios son cansancio, diarrea y problemas cutáneos.

Las terapias utilizadas para CRC buscan erradicar a las células cancerosas por medio de un mecanismo intracelular que lleva a la muerte celular.

### *3.2 Muerte celular.*

La muerte celular es una actividad fundamental altamente organizada y compleja que se clasifica de acuerdo con cambios morfológicos, criterios enzimológicos, aspectos funcionales o características inmunológicas propias de la muerte (Danial & Hockenbery, 2018).

La muerte celular puede ser un proceso accidental cuando es dada por factores físicos, químicos o mecánicos. Así mismo, puede darse de forma programada en procesos complejos como el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular, como una respuesta fisiológica normal a diversos estímulos que conllevan a la eliminación de células anormales, infectadas o que no puedan realizar sus funciones de manera correcta, entre otras cosas (Sjostrom, 2001).

Se define como un proceso regulado cuando la muerte esta mediada por una maquinaria molecular codificada genéticamente, la cual se puede ver alterada de manera farmacológica o genética, utilizando como blanco componentes clave de dichos procesos (Galluzzi et al., 2015).

A la fecha, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCD), han descrito diferentes mecanismos de MCR, las cuales se resumen en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Tipos de muerte celular regulada

<b>VÍA DE MUERTE</b>	<b>CARACTERÍSTICAS.</b>
<b>APOPTOSIS</b>	Existen dos vías de muerte: intrínseca y extrínseca. Se caracteriza por dependencia de la muerte a las caspasas.
<b>ANOKIS</b>	Variante de la apoptosis intrínseca que se caracteriza por la pérdida de anclaje dependiente de integrina.
<b>MC DEPENDIENTE DE AUTOFAGÍA</b>	Mecanismo de MCR que depende de la autofagia para iniciar el proceso. Se caracteriza por la formación de autofagolisosomas.
<b>AUTOSIS</b>	MCR dependiente de la autofagia que depende fundamentalmente de la Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática.
<b>MC ENTÓTICA</b>	Tipo de MCR que se origina a partir de la internalización (entosis) célula en célula dependiente de actomiosina y es ejecutado por lisosomas.
<b>FERROPTOSIS</b>	MCR iniciada por perturbaciones oxidativas del microambiente intracelular que se encuentra bajo control constitutivo por GPX4.
<b>MC INMUNOGÉNICA</b>	MCR que activa una respuesta inmune adaptativa en un hospedero inmunocompetente. Se caracteriza por la liberación de DAMPS (patrones moleculares asociados a daño).
<b>MC DEPENDIENTE DE LISOSOMAS</b>	Se caracteriza por permeabilización primaria de la membrana lisosomal, mediado por catepsinas, permeabilización de la membrana externa mitocondrial y caspasas.
<b>NECROSIS IMPULSADA POR LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (MPT)</b>	Se caracteriza por perturbaciones en el microambiente intracelular.

<b>MUERTE MITÓTICA</b>	Se caracteriza por catástrofe mitótica, es considerada una variante de la apoptosis intrínseca.
<b>NECROPTOSIS</b>	MCR desencadenada por perturbaciones de la homeostasis extracelular o intracelular que depende fundamentalmente de MLKL, RIPK3 y de la actividad quinasa de RIPK1.
<b>MC NETOTICA</b>	Mecanismo de MCR dependiente de ROS, dada únicamente en células hematopoyéticas y asociadas con las NETs.
<b>PARTANATOS</b>	Se caracteriza por hiperactivación de PARP1 y degradación del DNA.
<b>PIROPTOSIS</b>	Mecanismo de MCR que depende fundamentalmente de la formación de poros de la membrana plasmática por miembros de la familia de proteínas gasdermina.

Adaptada de: Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., & Agostinis, P. et al. (2018).

Con base a las características morfológicas de las células moribundas, el NCD estableció los siguientes criterios para determinar una célula muerta, o en proceso de muerte ( Galluzzi et al., 2007):

Criterios morfológicos para definir a las células muertas:

- Pérdida de la integridad de la membrana plasmática.
- Fragmentación celular (cuerpos apoptóticos).
- Ingesta por células adyacentes.

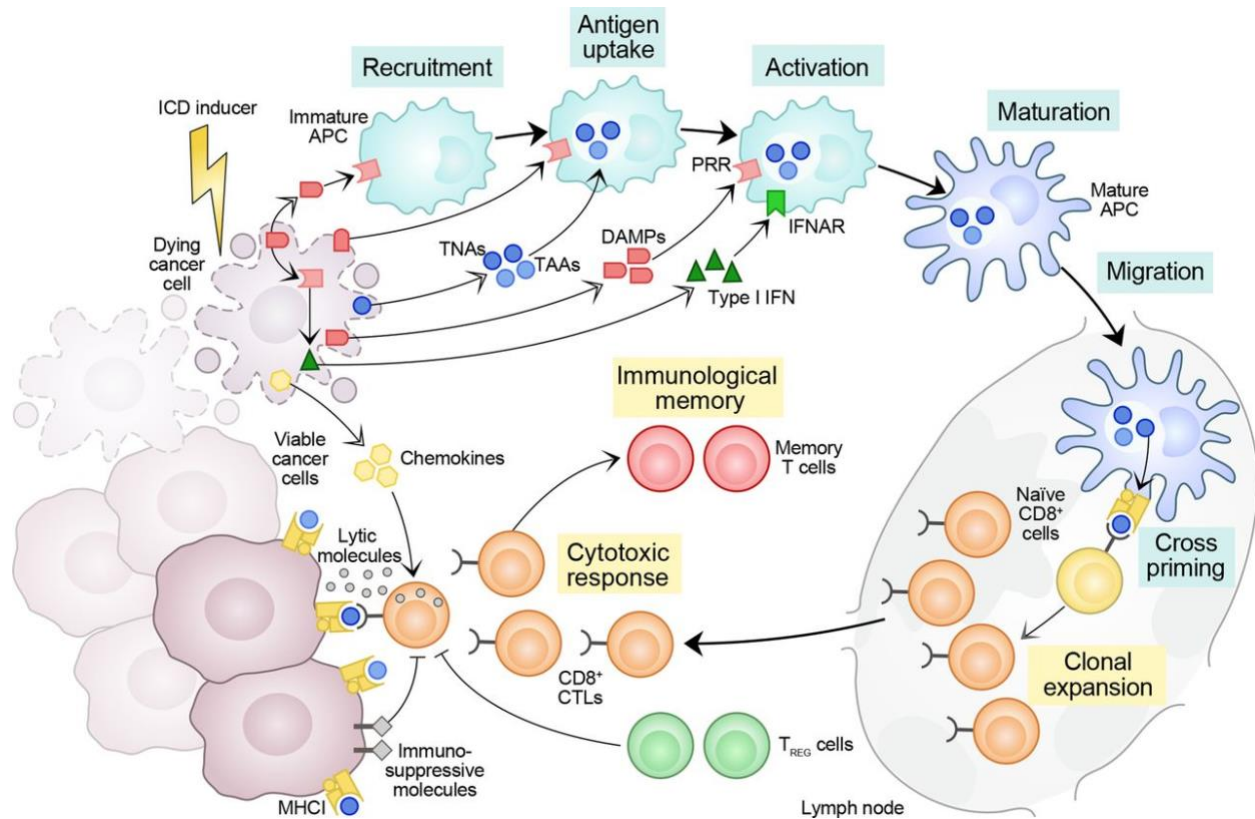
Puntos de no retorno para definir una célula muerta:

- Activación masiva de caspasas.
- Permeabilización de la membrana mitocondrial.
- Perdida del potencial de membrana mitocondrial.
- Exposición de fosfatidilserina.

Durante muchos años se pensó que la muerte celular regulada debía ser tolerogénica para evitar efectos negativos sobre el organismo. Sin embargo, recientemente se demostró que la muerte celular inmunogénica podría ser una herramienta útil contra casos de recaídas y resistencias a los tratamientos contra el cáncer.

### 3.2.1 Muerte celular inmunogénica.

La muerte celular inmunogénica (MCI) se define como un mecanismo de muerte celular regulado que es suficiente para activar una respuesta inmune adaptativa específica para antígenos endógenos o exógenos expresados por las células moribundas. Dicho mecanismo puede ser inducido por diversos estímulos, incluyendo quimioterápicos (como antraciclinas, brotezomib, entre otros), formas específicas de radioterapia y terapia fotodinámica basada en hipericina y fitoquímicos derivados de extractos naturales (Galluzzi et al., 2018).



**Figura 2.** Factores principales involucrados en el mecanismo de muerte celular inmunogénica (Galluzzi et al., 2020).



Se ha propuesto a la MCI como una alternativa para re-establecer la respuesta inmune anti-tumoral y atacar a las células cancerosas, tras inhibir su capacidad adquirida de inmunosupresión y tolerancia inmunogénica.

Este mecanismo de muerte depende de estrés en el retículo endoplásmico (RE) para la obtención de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; por sus siglas en inglés) (Garg, Dudek-Peric, Romano & Agostinis, 2015). Una de las características principales de la MCI es la liberación de DAMPs, cuyo reconocimiento es dado por receptores de reconocimiento de patógenos innatos que advierten al organismo de una situación de peligro, desencadenando la activación de una respuesta inmune asociada con el establecimiento de memoria inmunológica. Los DAMPs más estudiados y relacionados con la ICD son calreticulina (CALR), ATP, proteínas de grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), IFN tipo 1, ácidos nucleicos derivados de células cancerosas y anexina A1 (ANXA1). Sin embargo, se han encontrado otro tipo de DAMPs que contribuyen a la inmunogenicidad de la muerte, como las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), y metabolitos de esfingomielina (Galluzzi et al., 2018; Kepp et al., 2014).

#### 3.2.1.1 Papel de los DAMPs en la inmunogenicidad de la muerte.

##### Calreticulina (CALR).

La CALR es una proteína que se encuentra en el retículo endoplasmático y durante el proceso de MCI se transloca a la parte externa de la membrana plasmática, proceso que se ha reportado, es dado en procesos tempranos de la muerte (Galluzzi et al., 2018). La función principal de este DAMP es fungir como señal “cómeme” para la fagocitosis por células presentadoras de antígeno (APC), para posteriormente proceder a la presentación de antígeno a los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, CALR expuesto participa en la producción de IL-6 y TNF-  $\alpha$ , a partir de la maduración de células dendríticas, proceso que facilita la polarización de linfocitos cooperadores Th<sub>17</sub> (Pawaria & Binder, 2011).

## ATP

El ATP es liberado tras la activación de caspasas, sin embargo, previo a su liberación es necesaria su acumulación dentro de lisosomas, dependiente de autofagia. Posteriormente, es necesaria la relocalización de LAMP-1 (proteína de membrana asociada a lisosoma 1), de vesículas celulares dependientes de ROCK1 y la apertura de canales de PANAX (Galluzi et al., 2018). La principal función es actuar como señal “encuéntrame”, de corto alcance, para las APC y participa en la activación de células dendríticas. Además, se une a receptores purinérgicos ionotrópicos, como P2X7, los cuales participan en la activación del inflamosoma y en procesos apoptóticos mediados por caspasa 1, participa, también, en la secreción de IL-1 $\beta$ , la cual es una citocina mediadora de la inmunidad anti-tumoral (Chiba et al., 2012).

## Proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1).

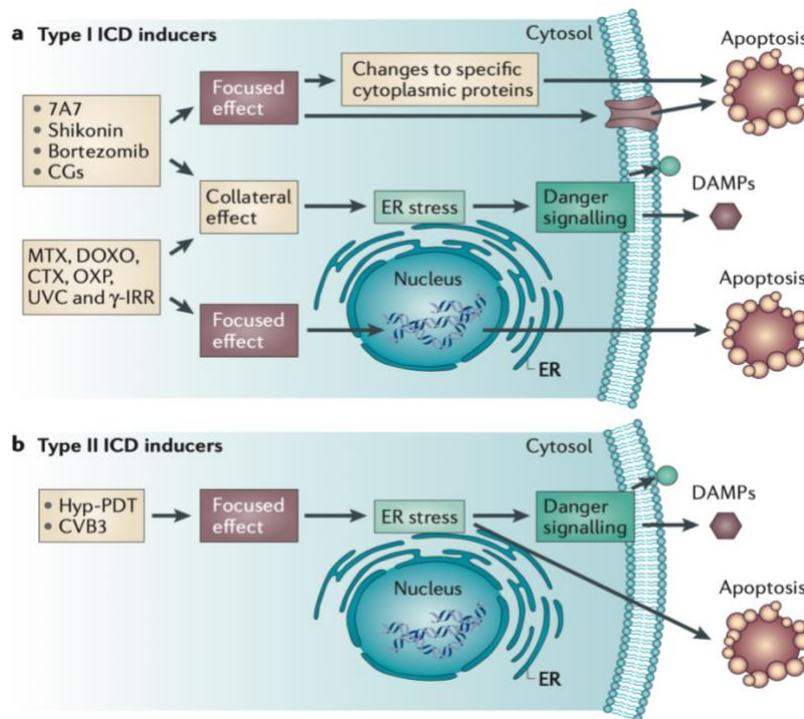
HMGB1 es una proteína que, en condiciones normales, se encuentra dentro del núcleo de las células; y se ha reportado es un agonista endógeno de los receptores tipo toll (TLR). En procesos de MCI, este DAMP es liberado y se une a TLR4 de las células dendríticas, promoviendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, participando en la presentación de antígeno y suprimiendo la actividad de los linfocitos T reguladores (T<sub>reg</sub>) (Kroemer et al., 2013; Zhu et al, 2011).

### 3.2.1.2. Tipos de inductores de MCI

A la fecha, se han descrito dos mecanismos de MCI basado en los inductores y las señales de daño liberadas:

MCI tipo I: el inductor no genera un daño directo al RE, sin embargo, hay un daño colateral a dicho organelo. La mayoría de los inductores de MCI entran dentro de esta clasificación, teniendo como objetivo el DNA, cromatina, efectos sobre la replicación del DNA, proteínas de reparación, citosólicas, de mitocondria, daños en la membrana celular y sobre ciertas proteínas o canales de membrana (Garg, Dudek-Peric, Romano & Agostinis, 2015).

MCI tipo II: se caracteriza por un daño directo al RE y la liberación de DAMPs asociadas a este organelo. Se han reportado quimioterapias inductoras de este tipo de MCI que tienen afinidad por el RE (Garg, Dudek-Peric, Romano & Agostinis, 2015).



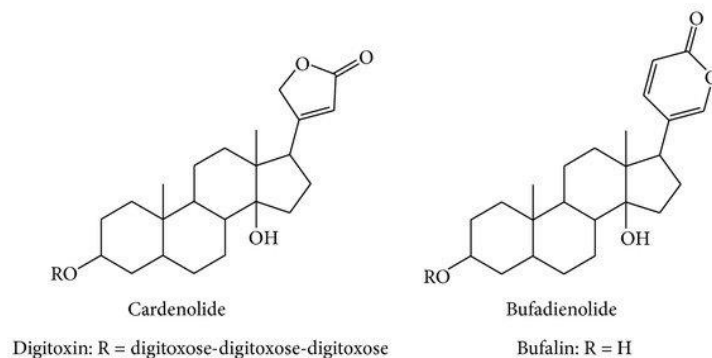
**Figura 3.** Tipos de inductores de muerte celular inmunogénica (Garg et al., 2013).

### 3.2.1.3. Inductores de MCI.

Recientemente, se han descrito diversos inductores de MCI, principalmente quimioterapias como doxorubicina, mitoxantrona, oxaliplatino y ciclofosfamida (Garg et al., 2010; Valls - Puig, 2003), terapias dirigidas y fitoquímicos extraídos de la naturaleza.

Los productos naturales contienen una variedad de compuestos que, a la fecha, han reportado tener potencial anti-inflamatorio y anti-tumoral (Orlikova, Legrand, Panning, Dicato & Diederich, 2013; Cerella et al., 2014; Mazumder et al., 2018). En este sentido, más del 60% de los medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer desarrollados entre 1981 y 2014, son elaborados a partir de un producto natural (Thornburg et al., 2018). Entre los fitoquímicos estudiados con potencial anti-tumoral y, principalmente como inductores de MCI, se han reportado los siguientes:

Glucósidos cardiacos (GC).

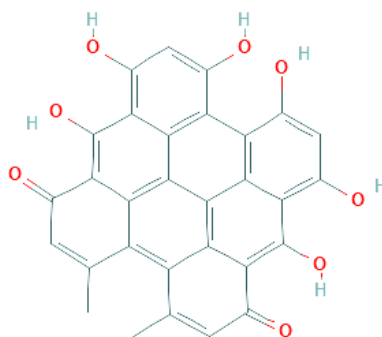


**Figura 4.** Estructura química de los Glucósidos cardiacos (Calderón-Montaña et al., 2014).

Son compuestos farmacológicamente activos provenientes de las plantas, cuya estructura química esta conformada por un esteroide unido a una molécula de azúcar y un grupo R. El núcleo de los esteroides esta formado por cuatro anillos unidos entre si, a los cuales se les unen grupos funcionales como metilos, hidroxilos y aldehídos, encargados de la función biológica de la molécula. Por otra parte, la principal función de las moléculas de azúcar es brindar solubilidad. Finalmente, la estructura del anillo unido en el extremo R de los GC permiten clasificarlo como cardenólido o bufadienólido, cuya principal diferencia radica en el número de enlaces presentes y su disponibilidad en las plantas, siendo los cardenólidos los más utilizados (Cheeke, 2020).

Se ha descrito que el tratamiento de GC en células cancerosas induce apoptosis o necroptosis, acompañada de mitofagia, un tipo de autofagia selectiva de mitocondrias, en tumores sólidos (Radogna, et al., 2016). Además, en 2012, Menger et al., reportó que el tratamiento *in vitro* con GC genera la exposición de CALR, liberación de ATP y HMGB1; y que la aplicación profiláctica de células cancerosas con GC previene el establecimiento tumoral *in vivo*.

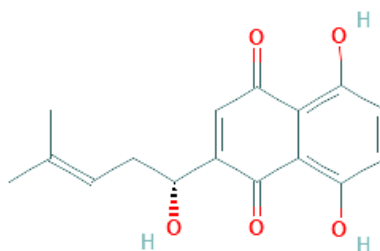
Hipericina y sus derivados.



**Figura 5.** Estructura química de la Hipericina (PubChem, 2020).

La hipericina es una antraquinona que predomina en *Hypericum perforatum*, cuya estructura esta conformada por anillos aromáticos polihidroxilados con o sin metilaciones. Actualmente, es utilizado como terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer y se ha reportado induce MCI a través de la liberación de CALR, exposición de ATP, maduración de células dendríticas, producción de INF- $\gamma$  en gliomas de alto grado (Garg et al., 2013; Verfaillie et al., 2013; Garg et al., 2016).

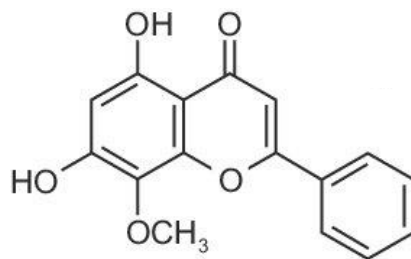
Shikonina.



**Figura 6.** Estructura química de la Shikonina (PubChem, 2020).

Fitoquímico proveniente de *Lithospermum erythrorhizon*, es una naftoquinona cuya estructura esta conformada por un par de anillos de benceno unidos. Es un fitoquímico con potencial anti-inflamatorio y anti-tumoral que se ha reportado induce MCI al utilizarse como vacunación profiláctica en un modelo de melanoma murino y de cáncer de mama (B16F10 y 4T1, respectivamente), previniendo el establecimiento tumoral. Además, *in vitro* se confirmo que induce la exposición de CALR, liberación de ATP, HMGB1, HSP70 y HSP90 (Che, et al., 2012; Yin et al., 2016).

Wogoning.



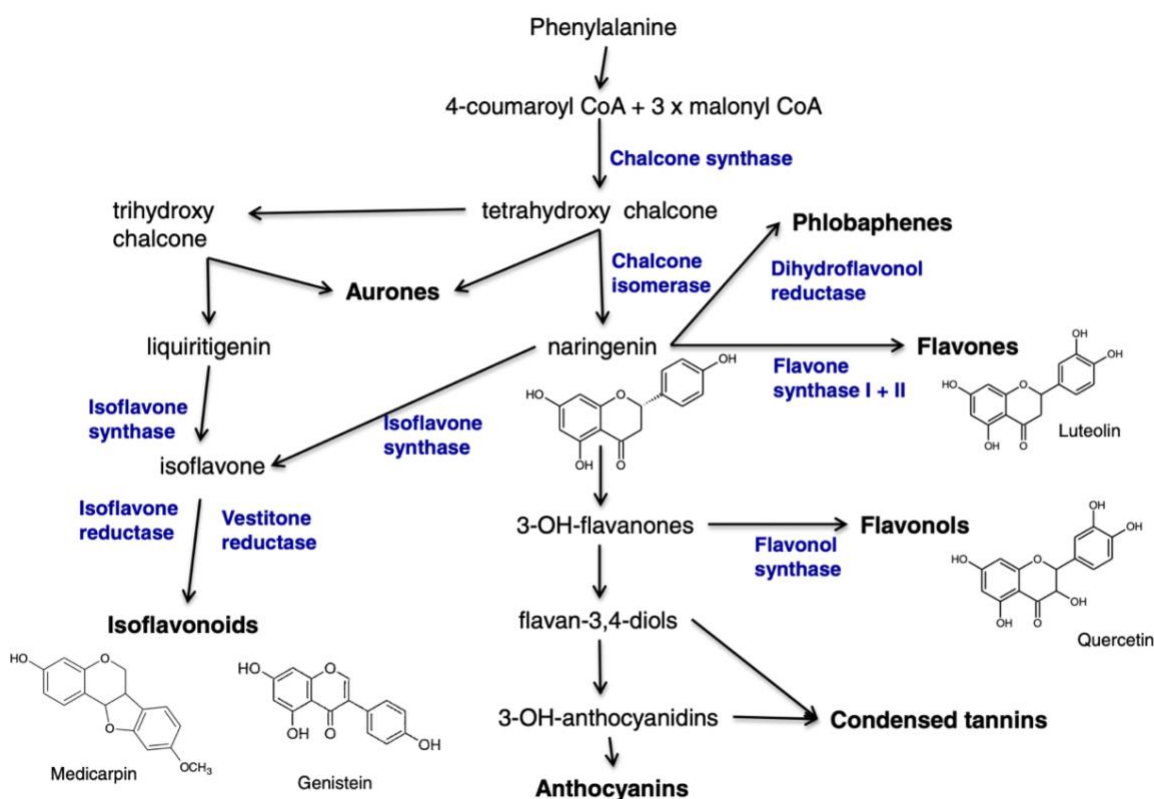
**Figura 7.** Estructura química de Wogoning (Sung-Park et al., 2015).

Es un polifenol proveniente de *Scutellaria baicalensis*, el cual induce estrés al RE de células cancerosas, además de producción de ROS, fosforilación de EIF2 $\alpha$ , y liberación de DAMPs como CALR, ATP y HMGB1 en carcinomas gástricos. *In vivo* se confirmó su potencial anti-tumoral al prevenir el establecimiento del mismo en ratones vacunados con lisados tumorales tratados con Wogoning (Yang et al., 2012).

A la fecha, solo una pequeña cantidad de compuestos naturales se han descrito como inductores de MCI, por lo tanto es necesario seguir indagando en la búsqueda de nuevos compuestos que induzcan dicho mecanismo de muerte, como los polifenoles, fitoquímicos que se encuentran presentes en gran cantidad de plantas y, que, se ha reportado que existen más de 2,000 tipos diferentes, los cuales pueden actuar como estresores o inductores de MCR en células cancerosas, dependiendo de su estructura química.

### 3.3 Polifenoles.

Los polifenoles son fitoquímicos polihidroxilados, en cuya estructura se encuentran anillos de benceno, y representan una amplia variedad de compuestos con estructuras similares entre si. De manera general, se dividen en tres clases principales, los flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides. Dentro de estas clases, se presentan subclases: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, estilbenos y lignabenos (Rajbhar, Dawda & Mukundan, 2015). Reportes recientes indican que la actividad biológica de dichas moléculas depende de la estructura de estas. En la Figura 8 se observa un resumen simplificado de la vía de biosíntesis de los polifenoles, sin embargo, pueden presentarse modificaciones dependiendo de la planta de origen (Weston & Mathesius, 2013).



**Figura 8.** Resumen simplificado de la vía biosintética los polifenoles de manera general (Weston & Mathesius, 2013).

Entre una amplia diversidad de plantas ricas en polifenoles, destaca *Opuntia ficus-indica*, planta icónica y endémica de México.

### 3.3.1 *Opuntia ficus-indica*

Las plantas del género *Opuntia* son cactáceas comestibles, nativas de América. Son plantas perennes, arbustiformes en su mayoría y espinosas con tallos carnosos. Se caracterizan por un tronco definido o ramificado desde la base con ramas erguidas, extendidas o postradas formadas por cladodios (o pencas) de color verde, con funciones fotosintéticas y dan origen a un fruto conocido como tunas (bayas ovoides cilíndricas). Es una planta con metabolismo de ácido crasuláceo, el cual le permite crecer en ambientes variados y le brinda la capacidad de acumular agua durante periodos prolongados de sequía (FAO, 2018).

México es un importante centro de diversificación del género *Opuntia* spp., en donde se han reportado alrededor de 93 especies; las cuales se distribuyen en casi todo el territorio mexicano desde un metro a nivel del mar hasta los 2700, la vegetación de *Opuntia* se denomina matorral xerófilo y, como se menciono previamente, se caracteriza por tolerar escasas de agua y altas temperaturas (SAGARPA, 2017). Dentro de las especies de *Opuntia*, aquella que destaca por su abundancia es *Opuntia ficus-indica*, demás de contener una mayor cantidad de polifenoles, principalmente flavonoides (Santos-Zea, Gutiérrez-Urbe & Serna-Saldivar, 2011). Cuya clasificación taxonómica se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Opuntia ficus-indica*.

REINO	PLANTAE
<b>DIVISIÓN</b>	Tracheophyta
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida
<b>ORDEN</b>	Caryophyllales
<b>FAMILIA</b>	Cactaceae
<b>GÉNERO</b>	<i>Opuntia</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>Opuntia ficus-indica</i>



La producción de *Opuntia*, principalmente *Opuntia ficus-indica* (OFI), en México es considerada como una de las actividades agrícolas con mayor impacto socioeconómico, y son las características de esta planta la que le brinda la facilidad de cultivarse en diferentes regiones a lo largo del país, lo que permite una producción anual estimada de 800 mil toneladas, ubicándonos como el principal productor y exportador de OFI a nivel mundial (SAGARPA, 2018).

#### 3.3.1.1 Composición química de *Opuntia*.

La composición química del género *Opuntia* puede variar según especie y madurez (24 - 48 días), en relación con esto se ha reportado que la presencia de vitaminas y minerales, como Ca y Vit. C aumentan conforme a la edad de la planta. Factores externos como las características del suelo, tales como acidez, salinidad, conductibilidad, hidratación, textura y nutrientes, sin embargo, de manera general se estiman valores de pH entre 5.0 y 6.0.

De diferentes familias de cactus se han identificado diferentes compuestos como carotenoides, fenoles, vitaminas y minerales como K, Mg, Zn, Mn, Vit. C y Ca, ácidos grasos, terpenoides y polisacáridos como (1→4)- $\alpha$ -D-glucano (El- Mostafa et al., 2014).

Los cladodios, comúnmente conocidos como pencas, son ricos en fibras solubles como pectinas y mucílagos, así como en minerales y compuestos fenólicos; estos últimos son de interés en el área de la salud ya que, según se ha reportado, son los responsables de los principales efectos biológicos atribuidos a *Opuntia spp.* (Rodríguez-García et al., 2007). Los cladodios de OFI son ricos en compuestos antioxidantes como polifenoles, flavonoides, y taninos; minerales como potasio y calcio; ácidos grasos como ácido palmítico, oleico, linoleico, y ácido esteárico; y aminoácidos (Glu, Val, Ser), esteroides y vitaminas, principalmente vit. C y vit. E (Aragona, Lauriano, Pergolizzi & Faggio, 2017).

En 2011, Santos-Zea y colaboradores reportaron, que OFI es una especie rica en polifenoles glicosilados. En este mismo estudio, se demostró que la isorhamnetina es el polifenol principal y con mayores variaciones de glicosilaciones. De los polifenoles presentes en OFI se hablará a continuación.

### 3.4 Polifenoles presentes en *Opuntia ficus-indica*.

*Opuntia ficus-indica* es una planta con un amplio contenido de compuestos fenólicos, entre los que predominan ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico, flavonoles y flavanoles (Amaya-Cruz et al., 2019).

Las betaxantinas y betacianinas, son polifenoles a los que se les atribuye la coloración de OFI y pertenecen a la familia de betalainas, los cuales son moléculas que contienen nitrógeno en su estructura y, se ha reportado, son solubles en agua (Castellanos, Santiago & Elhadi, 2008). En OFI, se ha reportado que las betacianinas se pueden encontrar glicosiladas o con un grupo acil en su estructura, mientras que, las betaxantinas son resultado de la conjugación de ácido betalaámico con diferentes aminoácidos proteícos o no proteícos, y aminos biogénicos (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000).

Los flavonoles que predominan en OFI son la isorhamnetina y el kaempferol, principalmente en sus formas glicosiladas. Kaempferol predomina en su forma diglicosilada, con moléculas de glucosa y ramnósido unidos a él, identificado como *(kaempferol-glucosyl-rhamnoside)*. Por otra parte, la isorhamnetina se encuentra con diferentes patrones de glicosilación predominando tres triglicósidos: *isorhamnetin-glucosyl-rhamnosyl-rhamnoside*, *isorhamnetin-glucosyl-rhamnosyl-pentoside* e *isorhamnetin-hexosyl-hexosyl-pentoside* (IG1, IG2 e IG3, respectivamente); y tres diglicósidos: *isorhamnetin-glucosyl-pentoside*, *isorhamnetin-glucosyl-rhamnoside*, e *isorhamnetin-hexosyl-pentoside* (IG4, IG5 e IG6, respectivamente) (Santos-Zea et al., 2011).

Otras moléculas reportadas presentes en OFI son el ácido ferúlico-hexósido, ácido dihidrosinápico y el ácido sinápico (Amaya-Cruz et al., 2019). El ácido ferúlico es un polifenol que se encuentra constituido por ácido transcinámico que lleva sustituyentes metoxi e hidroxilo en las posiciones 3 y 4, respectivamente, del anillo fenil (PubChem, 2020). Mientras que, el ácido dihidrosinápico y el ácido sinápico pertenecen al grupo de ácidos hidroxicinámicos, cuya estructura química se encuentra constituida por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en uno de sus extremos (Ferguson, Zhu & Harris, 2005). La nicotiflorina y la narcisina, son compuestos con estructura tipo flavonoide, la cual se ha reportado en altas concentraciones dentro de los cladodios de OFI y, que se han reportado, no son tan comunes de encontrarse en altas cantidades dentro de

la naturaleza. Otros polifenoles reportados en los cladodios de OFI son el ácido gálico, el ácido coumárico, el ácido salicílico y la rutina. Sin embargo, el contenido varía dependiendo de las condiciones en las que se encuentra la planta (El- Mostafa et al., 2014).

#### 3.4.1 Efecto biológico de los polifenoles presentes en *Opuntia ficus-indica*.

*Opuntia ficus-indica* es conocida como planta medicinal desde tiempos ancestrales, y es comúnmente utilizada para el tratamiento de dislipidemias, hiperglucemias, diabetes, además de utilizarse como cicatrizante, anti-inflamatorio tópico entre otros más usos (FAO, 2018).

Específicamente hablando de los polifenoles presentes en los cladodios de OFI, se ha reportado a la nicotiflorina como agente anti-inflamatorio y neuroprotector. Estudios previamente realizados reportan que este polifenol disminuye los daños cerebrales generados tras un infarto, atenúa los déficits generados por isquemia, además de regular a la alza la oxido nítrico sintasa, enzima que participa en la síntesis de oxido nítrico, en células cerebrales de ratas, cultivadas *in vitro* e *in vivo* (Li et al., 2006). Se ha reportado el potencial neuroprotector de la nicotiflorina en condiciones de estrés oxidativo, por hipoxia, o por glutamato (Nakayama et al., 2011). Además, las betaxantinas y betacianinas presentes en OFI aportan actividad hipoglucemiante e hiperlipidemiante, optimizando el estado de salud (El- Mostafa et al., 2014).

De la isorhamnetina presente en OFI, se ha encontrado que exhibe un efecto cardioprotector al mejorar la viabilidad de micitos ventriculares de ratas neonatales bajo condiciones de isquemia/reperfusión en modelos *in vitro*, a través de la inhibición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa y previniendo la muerte celular (Zhang et al., 2011). Así mismo, un estudio realizado en modelos murinos con obesidad inducida, suplementados con isorhamnetina, con o sin glicosilaciones, proveniente de OFI, reportó que previene el aumento de peso generado por dietas hipercalóricas, además de disminuir los niveles de colesterol y glucosa sanguíneos. Este mismo estudio reportó, *in vitro*, que el tratamiento con isorhamnetina mejora la sensibilidad a la insulina a través de la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$ , además de disminuir el tamaño de los adipocitos, que se encuentran correlacionados con los niveles sanguíneos de leptina. Finalmente, se reportó que disminuye la acumulación de grasa en hígado, previniendo la aparición de hígado graso no alcohólico (Rodríguez-Rodríguez et al., 2015).

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* con extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI han reportado potencial efecto anti-inflamatorio en modelos murinos con inflamación inducida, esto tras disminuir los niveles de TNF-  $\alpha$  , IL-6 y COX-2, citocinas pro-inflamatorias (Antunes-Ricardo et al., 2015).

En este sentido, se han propuesto a los polifenoles presentes en OFI como posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, reumatismo, isquemia cerebral, y, recientemente, cáncer.

#### 3.4.1.1 Polifenoles presentes en *Opuntia ficus-indica* y cáncer.

Se han realizado estudios en donde se reporta la capacidad de los extractos totales de OFI ricos en polifenoles, así como algunos polifenoles aislados, de inducir daño en células cancerosas, los cuales se irán describiendo a continuación.

En 2014, Antunes-Ricardo, et al., reportó que el tratamiento con un extracto alcalino de OFI rico en polifenoles, y los diglicósidos de isorhamnetina aislados de éste, inducen MCR en células de cáncer de colon *in vitro*. Dicho mecanismo se caracteriza por la activación de caspasas y exposición de fosfatidilserina, reportando como más efectivos el tratamiento con los diglicósidos aislados. En otro estudio, se reportó que la isorhamnetina induce muerte celular, que, además de ser dependiente de caspasas, se caracteriza por fragmentación del DNA, formación de cuerpos apoptóticos, daño mitocondrial, condensación de la cromatina y arresto en fase G2 del ciclo celular (Lee, 2008; El-Mostafa et al., 2014; Antunes-Ricardo et al., 2019). Se ha reportado que el tratamiento con isorhamnetina en células de cáncer de piel inhibe EGF a través de la reducción de las vías de señalización MAP/ERK cinasa 1 y PI3-k (Kim et al., 2011).

Asimismo, se ha reportado que ácido gálico presente en OFI, posee un efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de pulmón, próstata y leucemias *in vitro*, y éste se ha relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Ra-You & Park, 2010).

Uno de los principales retos en la identificación de fitoquímicos con potencial efecto citotóxico e inductores de muerte celular en células de cáncer, es el método de extracción. Se requiere disponer de un método de extracción que sea eficaz para obtener extractos ricos en los compuestos deseados, que no afecte su estabilidad y por lo tanto su bioactividad, pero que además nos permita obtener buenos rendimientos de extracción. A continuación, se describirán algunos métodos de extracción que se han reportado para la obtención de polifenoles a partir de *Opuntia ficus-indica*.

### 3.4.2 Método de obtención de polifenoles presentes en *Opuntia ficus-indica*.

Los métodos más efectivos utilizados para la obtención de estas moléculas son por microondas, sonicación y la extracción sólido-líquido, las cuales se describirán a continuación (Rajbhar, Dawda& Mukundan, 2015).

#### 3.4.2.1 Extracción asistida por microondas.

La extracción asistida por microondas (MAE), se basa en la utilización de microondas que penetran fácilmente por los poros de las muestras, atrapando el solvente y aumentando la temperatura de manera rápida y uniforme. Se caracteriza por ser un método rápido debido a que el calor se transfiere directamente al disolvente, tomando aproximadamente 20-30 minutos todo el proceso. Los principales inconvenientes de MAE es la necesidad de filtrar el extracto posterior a su obtención, la utilización específica de solventes polares, la falta de especificidad al momento de obtener los compuestos, así como los altos costos de los equipos y solventes, y la limitada escalabilidad del proceso (López-Ávila, 1999).

Polifenoles de OFI obtenidos por MAE.

Los principales polifenoles identificados en OFI por MAE son catequinas, 1-2-dihydroxy-benzeno, ácido gálico, ácido 3-4-dihydroxy-benzoico, glucósido de apigenina 7, y trihidrato de rutina. Además, en menores concentraciones se han identificado los siguientes ácidos: sirínico, cafeico, p-cumárico, trans-ferúlico, y transcinámico, así como resveratrol, quercetina, naringenina, kaempferol e isorhamnetina (Juhaimi et al., 2017). Sin embargo, los rendimientos de la mayoría de los polifenoles son menores a los reportados previamente por otros métodos de extracción, como la extracción sólido-líquido (Tounsi et al., 2011).

#### 3.4.2.2 Extracción asistida por sonicación.

Es un método de extracción cuyo mecanismo está basado en la eficiencia mecánica y de cavitación, que permite una mayor transferencia de masa debido a la rotura de la pared celular, y el sonido de las ondas del sonicador facilitan la extracción del soluto de la muestra a un ritmo más rápido. Es el método de extracción comúnmente utilizado para la obtención de compuestos fenólicos de frutas como la yaca, granada, y piña. Se caracteriza por ser una extracción relativamente rápida (30 – 60 min por muestra) y permite una alta tasa de rendimiento a bajos costos (Karunanithi & Venkatachalam, 2019). Sin embargo, las principales desventajas de la extracción por sonicación reportados son la degradación de los compuestos presentes en la muestra y cambios en la composición de algunos compuestos debido al incremento de temperatura, principalmente aquellos que tienen azúcares en su estructura, además de la dificultad de escalarla a nivel industrial debido al gasto energético generado (Ebringerová & Hromádková, 2010).

#### Polifenoles de OFI obtenidos por sonicación.

Por este método de extracción se obtienen moléculas muy simples, lo cual es atribuido a las altas temperaturas y el movimiento constante durante tiempo prolongado, lo cual genera el rompimiento inespecífico de enlaces presentes en moléculas complejas, dando como resultado estructuras simples (Ebringerová & Hromádková, 2010).

#### 3.4.2.3 Extracción por fluidos supercríticos.

La extracción por fluidos supercríticos se caracteriza por ser un método rápido, con la utilización de pequeñas cantidades de solvente y sin generar impacto negativo al medio ambiente (López-Ávila, 1999). Las principales desventajas que se han reportado para este método de extracción son la falta de especificidad en la obtención de compuestos y bajas tasas de rendimiento, así mismo la pérdida de compuestos debido a las altas presiones que dificultan la adición continua de sólidos al extracto, y los altos costos de operación (Ronquillo-Moreta & Yugcha-Alomaliza, 2019).

Los principales polifenoles obtenidos por este método de extracción son la isorhamnetina y sus glicósidos, predominando los triglicósidos IG1, IG2, e IG3, y los diglicósidos IG4 e IG5 (Antunes-Ricardo, et al., 2018). Otros polifenoles reportados en *Opuntia* spp. obtenidos a través de extracción por fluidos supercríticos son catecol, ácidos como coumárico, cinámico, vanillin,

gálico, caféico, ferúlico, hidroxicaféico, así como apigeninas, butaina y catequinas (Koubaa et al., 2016).

#### 3.4.2.4 Extracción sólido-líquido de polifenoles

La extracción sólido-líquido convencional se ha reportado como la forma más efectiva, a nivel laboratorio, para el aislamiento específico de polifenoles, basándose en características estructurales de las moléculas de interés y los solventes utilizados. Los solventes comúnmente usados son alcoholes, acetonas, N-N-dimethylformamida, hidróxido de sodio (NaOH) y agua, así como combinaciones entre los mismos (Rajbhar, Dawda & Mukundan, 2015; Wissam, Ghada, Wassim, Warid, 1999).

El metanol (MeOH) y etanol (EOH) son los alcoholes comúnmente utilizados debido a la fácil solubilidad con los extractos en polvo, para eficientizar la obtención, la mezcla se realiza en condiciones específicas de temperatura y agitación, las cuales son seleccionadas dependiendo de las moléculas de interés. Para los polifenoles, se recomienda no exceder de los 40°C, con el objetivo de prevenir su degradación y se ha reportado que el uso de metanol permite una mayor obtención de polifenoles, esto debido a la polaridad con dichos compuestos (Ammar, Ennouri & Attia, 2015)

Por otra parte, la extracción mediante hidrólisis alcalina con NaOH es utilizado principalmente para la obtención de polifenoles con residuos de azúcar en su estructura. El fundamento de dicho método se basa en el rompimiento de enlaces glucosídicos para brindar mayor estabilidad al compuesto. Sin embargo, una de las principales desventajas de este método de extracción es la pérdida de ácidos fenólicos presentes (Nardini et al., 2002; Scalbert et al., 1985).

Una vez obtenidos los extractos ricos en polifenoles, se procede con ensayos de identificación y caracterización por métodos como cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas, las más utilizadas para los polifenoles. Y detectándose en longitudes de onda que varían desde los 255 hasta los 535 nm (Rajbhar, Dawda & Mukundan, 2015; Wissam, Ghada, Wassim, Warid, 1999; Santos-Zea et al., 2011; Cayuela, et al., 2019).

Extracción sólido-liquido de polifenoles a partir de OFI.

De los solventes comúnmente utilizados, el MeOH y NaOH son los mayormente reportados para la obtención de polifenoles a partir de OFI debido a que se obtienen mayores tasas de rendimiento al utilizar estos solventes para su extracción. En los extractos metanólicos se ha reportado la presencia de isorhamnetina, kaempferol, ácido ferúlico, ácido psídico, betalainas, quercetina, kaempferol, glicósidos de isorhamnetina, y glicósidos de kaempferol. Se ha reportado un perfil similar con el uso de NaOH como solvente, sin embargo, éste último presenta una tasa de rendimiento menor para gran parte de los polifenoles, a excepción de la isorhmanetina y sus derivados glicosilados (Saleem, Kim, Han, Jin & Lee, 2006; Santos-Zea et al., 2011; Antunes-Ricardo et al., 2018).

Con base a la información previamente mencionada, queda implícita la importancia de seguir investigando en el efecto citotóxico sobre células cancerosas de los polifenoles presentes en OFI, y el solvente utilizado en el método de extracción que permita un mayor rendimiento de dichos compuestos, sin comprometer su actividad biológica.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer de colon (CRC) es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia y tercero con mayor mortalidad; siendo el segundo tipo más común en mujeres y el tercero en hombres, cuya incidencia se encuentra en aumento, reportándose, en 2018, más de 1,000,000 de casos a nivel mundial. En México, se reporta al cáncer como la tercera causa de muerte, reportándose un 14% de las causas de muerte, a esta enfermedad.

Las estrategias terapéuticas para el cáncer de colon presentan limitantes como la localización del tumor, la falta de especificidad de las terapias de primera mano, así como los efectos adversos, los cuales comprometen la calidad de vida de las personas con CRC. Aunado a esto, la capacidad de las células cancerosas a generar resistencia y de utilizar al sistema inmunológico para su desarrollo compromete la efectividad de las terapias y conllevan a un mal pronóstico. Es por lo mencionado anteriormente, que es necesario indagar en la búsqueda de terapias alternas, las cuales permitan atacar a las células cancerosas de manera específica, sin dañar a las demás células del cuerpo.

Una forma innovadora para implementar nuevas herramientas es a través del uso de extractos ricos en fitoquímicos, como los polifenoles, presentes en las plantas, para evaluar sus capacidades terapéuticas. Sin embargo, antes de su aplicación, es necesario identificar los compuestos presentes en dichos extractos, cuantificarlos, y determinar el método de extracción que permita un mayor rendimiento de los polifenoles, sin afectar su actividad biológica. Además, es necesario determinar el efecto citotóxico en células cancerosas y, su efecto sobre células no cancerosas, para, posteriormente, determinar las dosis óptimas de tratamiento y su aplicación terapéutica.

A la fecha, el estudio de extractos ricos en polifenoles provenientes de diversas plantas para el tratamiento del cáncer se lleva a cabo, con el fin de lograr la erradicación del tumor. Sin embargo, los resultados no han sido óptimos a causa de las dificultades que se presentan al momento de la elaboración del extracto, por lo tanto, es necesario la utilización de plantas ricas en polifenoles, que además resistan los procesos de extracción. En este sentido, se propone a *Opuntia ficus-indica* (OFI), mejor conocido como nopal, una planta endémica mexicana, la cual ha sido utilizada a lo largo del tiempo como planta medicinal para el tratamiento de enfermedades crónicas y, recientemente, se reportó efecto anti-tumoral *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, es necesario analizar el impacto de los solventes utilizados para la extracción de los polifenoles presentes en OFI, en la actividad citotóxica y el rol que juega el sistema inmunológico que induce dicho extracto en el mecanismo de muerte de las células cancerosas.

## 5. HIPÓTESIS.

Los extractos ricos en compuestos fenólicos presentes en OFI inducen muerte celular inmunogénica en las líneas de cáncer de colon Caco-2, CT-26 y HT-29.

## 6. OBJETIVO

Evaluar si los extractos ricos en polifenoles presentes en OFI inducen muerte celular inmunogénica en las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2, CT-26 y HT-29.

### 6.1 *Objetivos específicos.*

1. Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos presentes en OFI por medio de la extracción líquido-sólido usando dos diferentes solventes de extracción, cuantificar y caracterizar las principales moléculas presentes.
2. Evaluar el potencial efecto citotóxico de los extractos ricos en compuestos fenólicos presentes en OFI en células de CRC Caco-2, CT-26 y HT-29, así como en PBMCs.
3. Determinar la inmunogenicidad de la muerte, *in vitro* e *in vivo*, inducida por los extractos ricos en compuestos fenólicos presentes en OFI en la línea celular CT-26.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 *Preparación del extracto de OFI*

Se llevó a cabo la preparación del extracto de OFI total por medio de los métodos de extracción solido-líquido más reportados para esta matriz vegetal, extracción mediante hidrólisis alcalina y extracción metanólica, que serán descritos a continuación.

#### 7.1.1 Preparación del extracto mediante hidrólisis alcalina.

Para la preparación del extracto de OFI mediante hidrólisis alcalina, se utilizó 1 g de harina de nopal obtenida según lo reportado previamente (Santos-Zea, Gutiérrez-Urbe, Serna-Saldívar, 2011) y se disolvieron en 10 mL de NaOH 4N (hidróxido de sodio), posteriormente se dejó en agitación en una cabina de agitación (Innova 4000; New Brunswick Scientific Inc., USA) a 150 rpm durante 30 min. a 40° C. Posteriormente, se ajustó el pH a 2 con HCl concentrado (ácido clorhídrico); se centrifugó la muestra a 3500 xg durante 10 min a 4° C (IEC Centra MP4R, International Equipment Co.) y se procedió a fraccionar el sobrenadante con n-hexano (1:1 v/v) para la eliminación de lípidos y clorofila. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se agregó acetato de etilo (1:1 v/v) para eliminar compuestos fenólicos libres. Se centrifugó nuevamente la muestra a 3500 xg durante 10 min a 4° C, y esta vez se conservó la fracción inferior del extracto; finalmente, se filtró la muestra con un papel de filtro Whatman no. # 1. Una vez filtrada la muestra, se fraccionó el extracto en un cartucho GracePure™ SPE C18-A1 de 1000 mg/6 mL (Grace-Davison, Deerfield, IL, USA) obteniendo un extracto rico en flavonoides tras la elución con 100% metanol. Una vez obtenido el extracto, se secó al vacío a 40° C durante 50 min, (Genevac Rocket, Ipswich, UK), para eliminar el disolvente presente en la muestra. Finalmente, la fracción se liofilizó (Labconco Kansas City, MO, USA) y se congeló a -80° C.

#### 7.1.2 Extracción metanólica.

Para la preparación del extracto metanólico de OFI, se utilizó 1 g. de harina de nopal obtenida según lo reportado previamente (Santos-Zea, Gutiérrez-Urbe, Serna-Saldívar, 2011) y se disolvieron en 10 mL de metanol 80% v/v (DEQ); posteriormente se dejó en agitación en una cabina de agitación (Innova 4000; New Brunswick Scientific Inc., USA) a 150 rpm durante 2 horas a 40° C. Posteriormente, la muestra se centrifugó 10 minutos a 3000 xg a 4°C (IEC Centra MP4R,

International Equipment Co.). Finalmente, la muestra se filtró con un papel de filtro Whatman. No. # 1. Una vez filtrada la muestra, se fraccionó el extracto en un cartucho GracePure™ SPE C18-A1 de 1000 mg/6 mL (Grace-Davison, Deerfield, IL, USA) obteniendo un extracto rico en polifenoles tras la elución con 100% metanol. Una vez obtenido el extracto, se secó al vacío a 40° C durante 50 min, (Genevac Rocket, Ipswich, UK), para eliminar el disolvente presente en la muestra. Finalmente, la fracción se liofilizó (Labconco, Kansas City, MO, USA) y se congeló a -80° C.

#### 7.1.3 Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Una vez obtenidos los extractos de OFI, por ambos tipos de extracción, se procedió con la cuantificación de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu según lo reportado por Acosta-Estrada et al. (2015). Veinte microlitros (20 µL) de una dilución 1:10 (v/v) del extracto alcalino o metanólico, se hicieron reaccionar en una microplaca de 96 pocillos con 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu al 10% en agua destilada. La mezcla se incubó durante 30 min. Luego, se agregaron 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.5% (p/v) y se incubaron a 37 °C durante 1.5 h en la oscuridad. Después de la incubación, se midió la absorbancia a 725 nm usando un lector de microplacas Synergy HT (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Los cálculos se realizaron utilizando una curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron como ppm. Cada muestra se midió por triplicado (n = 3). Se prepararon diluciones cuando fue necesario.

#### 7.1.4 Cuantificación de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Una vez obtenido el extracto de OFI, mediante ambos tipos de extracción, se procedió con la cuantificación de compuestos fenólicos por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD;1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); se inyectaron 5 µL de la muestra y la separación se realizó con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4.6 mm (5 µm) a 30° C con un flujo de 0.50 mL/min. Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: a) Agua de grado HPLC con ácido fórmico al 0.1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y b) Metanol de grado HPLC al 100%. La separación se logró comenzando con 0% de metanol durante los primeros 10 minutos, aumentando su concentración a 15% de B durante los primeros 10 minutos y luego aumentándola a 25% de B

durante los siguientes 5 minutos, posteriormente se incrementó a 50% de B durante los 10 minutos posteriores 65% de B al minuto 30, 80% de B en los siguientes 5 minutos para finalmente reducirse a 0% de B al minuto 40. Se utilizaron estándares de ácido gálico, ácido ferúlico e isorhamnetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la cuantificación de los compuestos obtenidos a 280nm, 320 nm, y 365 nm, respectivamente. Los espectros de absorción ultravioleta visible (UV vis) se registraron para los picos predominantes.

#### 7.1.5 Identificación de los compuestos fenólicos por LC/MSD-TOF

Posteriormente, se procedió con la identificación tentativa de los compuestos por medio de espectrometría de masas-tiempo de vuelo [LC/MSD-TOF] (1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas descritas para el análisis de HPLC-DAD (sección 7.1.4). El análisis de masas se realizó usando una fuente de electrospray (ESI) en modo positivo bajo las siguientes condiciones:

- m/z: 1000-1500,
- Temperatura del gas: 35°C,
- Velocidad del flujo de gas de secado 14/min,
- Presión del nebulizador: 50 psig,
- Voltaje capilar: 4000 V
- Voltaje del fragmentador: 70 V.

### 7.2 Ensayos *in vitro*.

#### 7.2.1 Mantenimiento de las líneas celulares.

Para este proyecto se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colon: Caco-2, HT-29 y CT-26 (adenocarcinomas de colon humano y de ratón, respectivamente), disponibles en el banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) ubicado en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México y del Centro de Biotecnología FEMSA del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) Campus Monterrey.

Las células Caco-2 se cultivaron en *Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM; Duplecco) adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY, USA) y 1% antibiótico (penicilina, estreptomicina y neomicina; Gibco, Grand Island, NY, USA); mientras que CT-26 y HT-29 se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI; Gibco, Grand Island, NY, USA) adicionado con 1% glucosa, 10% SFB y 1 % antibiótico. Se mantuvieron incubadas en una atmósfera controlada a 37° C con una humedad del 5% de CO<sub>2</sub>.

El mantenimiento de las líneas celulares se realizó cada 3 días, cuando había una confluencia de 80 - 90%; se retiró el medio de cultivo, se lavó la caja de cultivo en donde se encontraban las células con PBS (buffer de fosfatos salinos) a un pH de 7.4, se utilizó 1 mL de tripsina-EDTA si rojo fenol 0.5% (Gibco, Grand Island, NY, USA) al 1% durante 5 min. para despegar las células, posteriormente se colocaron en un tubo de polipropileno para centrífuga de 15 mL (Corning, Inc., Corning, NY, USA) y se centrifugaron a 1,250 rpm durante 5 min. El conteo de células viables se llevo a cabo tiñéndolas con azul de tripan (solución 0.4 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se colocaron en una cámara de Neubauer y se observaron en un microscopio óptico (Zeiss Primo Star, Zeiss-Vision; Oberkochen, Germany) y se siguió el protocolo establecido por la *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 7.2.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Como control para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) como control sano no tumoral. Se extrajeron 5 mL de sangre en tubos con heparina de sodio, proveniente de pacientes sanos. La separación de células se llevo a cabo por gradiente de densidad y se realizó una dilución 1:1 en PBS para posteriormente vaciarla lentamente en tubos que contenían un volumen de Ficoll atemperado (Histopaque® -1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), en proporción 1:1. Una vez realizada la dilución se centrifugó por media hora a 1600 rpm en una centrifuga plana sin frenos. Una vez separadas las células por capas, se tomó la correspondiente a PBMC, se contaron en una cámara de Neubauer y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% SFB y 1% antibiótico.

#### 7.2.4 Ensayos de viabilidad celular por MTT.

Se sembraron  $4.5 \times 10^3$  células Caco-2, CT-26 y HT-29 en cajas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc., Corning, NY, USA), y se incubaron durante 24 h, posteriormente se trataron a diferentes concentraciones de los extractos: OFI-alcalino (1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000  $\mu\text{g/mL}$ ) y OFI-metanólico (1000, 1500, 2000, 2500 y 3000  $\mu\text{g/mL}$ ), se incubaron las células tratadas durante 24 h, se realizaron los tratamientos y se añadió 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con 20  $\mu\text{L}$  de MTT (0.5 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), se dejaron incubando por 3 h, hasta la formación de cristales de formazan, los cuales se re-suspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (BioBasics, Markham, ON, Canadá), una vez retirado el MTT. La placa se leyó en un lector de placas (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 570 nm.

Para los ensayos de MTT en PBMC, una vez extraídas de pacientes sanos, se sembraron  $4 \times 10^5$  en caja de cultivo de 96 pozos (Corning, Inc., Corning, NY, USA), posteriormente se trataron a diferentes concentraciones del extracto de OFI alcalino y metanólico (dosis iguales a las utilizadas para las líneas de CRC), se incubaron las células tratadas durante 24 h, se realizaron lavados con PBS estéril y se añadió 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con 20  $\mu\text{L}$  de MTT (0.5 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), se dejaron incubando por 3 h, hasta la formación de cristales de formazan, los cuales se re-suspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (BioBasics, Markham, ON, Canadá), una vez retirado el MTT. La placa se leyó en un lector de placas (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) a 570 nm.

#### 7.2.5 Ensayos de viabilidad celular con Calcein-AM por citometría de flujo.

En una placa de cultivo de 24 pozos (Corning, Inc., Corning, NY, USA) se sembraron  $3.5 \times 10^4$  de células CT-26 y HT-29, y  $4 \times 10^4$  de Caco-2, se incubaron durante 24 h, posteriormente se trataron a diferentes concentraciones del extracto de OFI-alcalino (1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000  $\mu\text{g/mL}$ ) y OFI-metanólico (1000, 1500, 2000, 2500 y 3000  $\mu\text{g/mL}$ ), se incubaron las células tratadas durante 24 h. Posteriormente, se recuperaron las células tratadas, en tubos de 1.5 mL (Axygen, Inc., NY, EUA), y se agregaron 0.0025  $\mu\text{L}$  / 100  $\mu\text{L}$  PBS del marcaje Calcein-AM (0.25  $\mu\text{M}$ ; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); se incubaron las células con el marcaje durante 20 min a 37°C, se lavaron las células con PBS, se centrifugaron y se re-suspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. La



fluorescencia se midió en FL-1 del citómetro de flujo (citómetro de flujo BD Accuri™ C6) y los resultados se analizaron con el software FlowJo (Becton Dickinson and Company).

Para los ensayos de Calcein-AM en PBMC se sembraron  $1 \times 10^5$  por pozo en una placa de 24 pozos y se trataron a diferentes concentraciones de OFI-alcalino (1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000  $\mu\text{g/mL}$ ) y OFI-metanólico (1000, 1500, 2000, 2500 y 3000  $\mu\text{g/mL}$ ), se incubaron las células tratadas durante 24 h. Posteriormente, se recuperaron las células tratadas y se agregaron 0.1  $\mu\text{L}$  / 100  $\mu\text{L}$  PBS del marcaje Calcein-AM (0.25  $\mu\text{M}$ ; Invitrogen Carlsbad, CA, EUA); se incubaron las células con el marcaje durante 20 min a 37°C, se lavaron las células con PBS, se centrifugaron y se re-suspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. La fluorescencia se midió en FL-1 del citómetro de flujo (citómetro de flujo BD Accuri™ C6) y los resultados se analizaron con el software FlowJo (Becton Dickinson and Company).

#### 7.2.6 Ensayos de la exposición de calreticulina.

Se sembraron  $3.5 \times 10^4$  de células CT-26 en placas de 24 pozos (Axygen, Inc., NY, EUA), se dejaron incubando durante 24 h, posteriormente se trataron a  $\text{CC}_{50}$  y  $\text{CC}_{100}$  de OFI-alcalino y OFI-metanólico. Las células se recuperaron, centrifugaron, se retiró el sobrenadante, se añadió 0.1  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo anti-CALR (1:1000; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA) y se dejó incubando por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las muestras con 1 mL de PBS y se les añadió 0.034  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo secundario marcado con PE (1:1500; DATOS) y se dejó incubando por 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras con 1 mL de PBS y se les añadió 100  $\mu\text{L}$  FACS buffer 2%. La fluorescencia se midió en FL-2 por citometría de flujo (citómetro de flujo BD Accuri™ C6) y los resultados se analizaron con el software FlowJo (Becton Dickinson and Company).

#### 7.2.7 Ensayos de liberación de ATP.

El sobrenadante de las células control y tratadas con el  $\text{CC}_{50}$  y  $\text{CC}_{100}$  de OFI-alcalino y OFI-metanólico, se transfirió a tubos estériles de 1.5 mL (Axygen, Inc., NY, EUA) y se colocó 100  $\mu\text{L}$  en una placa de 96 pozos, de poliestileno blanca, se evaluó la liberación de ATP mediante bioluminiscencia utilizando el kit ATP Determination Kit (A22066), de acuerdo con el protocolo

del fabricante (PROMEGA; Madison, Wiskonsin, EUA). La absorbancia se evaluó mediante lectura óptica en un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek, Software Gen5. Winooski, Vermont. EUA) a 560 nm.

#### 7.2.8 Ensayos de liberación de HMGB1.

El sobrenadante de las células control y tratadas con el CC<sub>50</sub> y CC<sub>100</sub> de OFI-alcalino y OFI-metanólico, se transfirió a tubos estériles de 1.5 mL (Axygen, Inc., NY, EUA) y se colocó 100 µL en una placa de cultivo, la liberación de HMGB1 extracelular se evaluó utilizando el kit ELISA HMGB1 (BioAssay ELISA kit Mouse. USBiologicals; Salem, Massachusetts; EUA) para CT-26, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se evaluó mediante lectura óptica en un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek, Software Gen5. Winooski, Vermont EUA) a 460 nm.

### 7.3 Ensayos *in vivo*.

Este proyecto se sometió al Comité de Ética y Cuidado Animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL (CEIBA 2020-003). Una vez aprobado, se realizaron los siguientes ensayos:

#### 7.3.1 Material animal.

Se utilizaron ratones BALB/c blancos, machos, de 6 a 8 semanas de edad y peso entre 20 – 25 g, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 h luz – 12 h oscuridad, y se alimentaron con dieta para roedores y agua *ad libitum*.

#### 7.3.2 Establecimiento tumoral.

Para establecer el número de células necesarias para la inoculación, los ratones se dividieron en 2 grupos de ratones macho, con 3 ratones por grupo, a los cuales se les inocularon  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células CT-26 viables, y se observó el desarrollo del tumor. Se seleccionó el número de células que no comprometiera la calidad de vida del animal durante los ensayos.

### 7.3.3 Vacunación profiláctica.

Se trataron  $1.5 \times 10^6$  número de células CT-26 con el IC100 del extracto metanólico, y posterior a las 24 h de tratamiento, se corroboró la muerte a través de cuenta con azul de tripán, contando con cámara de Neubauer. Posteriormente se inocularon las células en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  en el flanco derecho de manera subcutánea en el grupo de ratones inmunizados al día -7.

Al día 0, se inocularon  $1.5 \times 10^6$  células CT-26 viables re-suspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo RPMI sin SFB, en el flanco izquierdo en los grupos control e inmunizado.

### 7.3.4 Obtención del índice tumoral.

Se obtuvieron los índices tumorales con base al volumen  $\text{mm}^3$ . A lo largo de los ensayos se tomaron medidas de los tumores y peso de los ratones cada tres días, a partir del día 0. Las medidas de los tumores se realizaron con un vernier digital (CAPRI tools) para obtener el volumen que reflejará el índice tumoral; por otra parte, el peso de los ratones se tomó con una balanza digital (AWS). Los datos obtenidos se graficaron y se realizaron análisis estadísticos para obtener las diferencias significativas entre los grupos.

### 7.3.5 Evaluación de la sobrevida de los ratones.

El comportamiento de los ratones se monitoreo a lo largo de los ensayos y se evaluó su sobrevivencia. Los ratones con un tumor con un tamaño que rebasa lo estipulado en la ética del trato de animales (NOM-062-ZOO-1999) se sacrificaron por dislocación cervical, los datos obtenidos se graficaron y se realizaron análisis estadísticos.

## 7.4 Análisis estadístico.

Para los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* con una distribución normal, se analizaron mediante prueba t de Student (paramétrica). Por otra parte, para los datos obtenidos que no presentan una distribución normal se analizaron por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Para los experimentos *in vivo*, los ratones utilizados fueron asignados al azar.

Las pruebas se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism 8. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces y los valores de  $*p < 0.05$  se consideraron significativos.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1 Cuantificación de fenoles totales presentes en los dos extractos ricos en polifenoles de OFI.

Se realizó el ensayo Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de fenólicos totales el extracto alcalino (OFIa) y metanólico (OFIm), los cuales se cuantificaron en ppm (partes por millón; 1000 ppm = 1 µg/mL). Para el extracto alcalino de OFI, se encontró una concentración de  $3929.86 \pm 159.11$  ppm, mientras que para el extracto metanólico se reportó una concentración de  $2436.81 \pm 287.42$  ppm de polifenoles presentes, como se observa en la Tabla 3. Estos resultados nos permiten concluir que por medio del extracto alcalino se obtiene una mayor cantidad de fenólicos totales.

**Tabla 3.** Cuantificación de polifenoles por método de Folin-Ciocalteu.

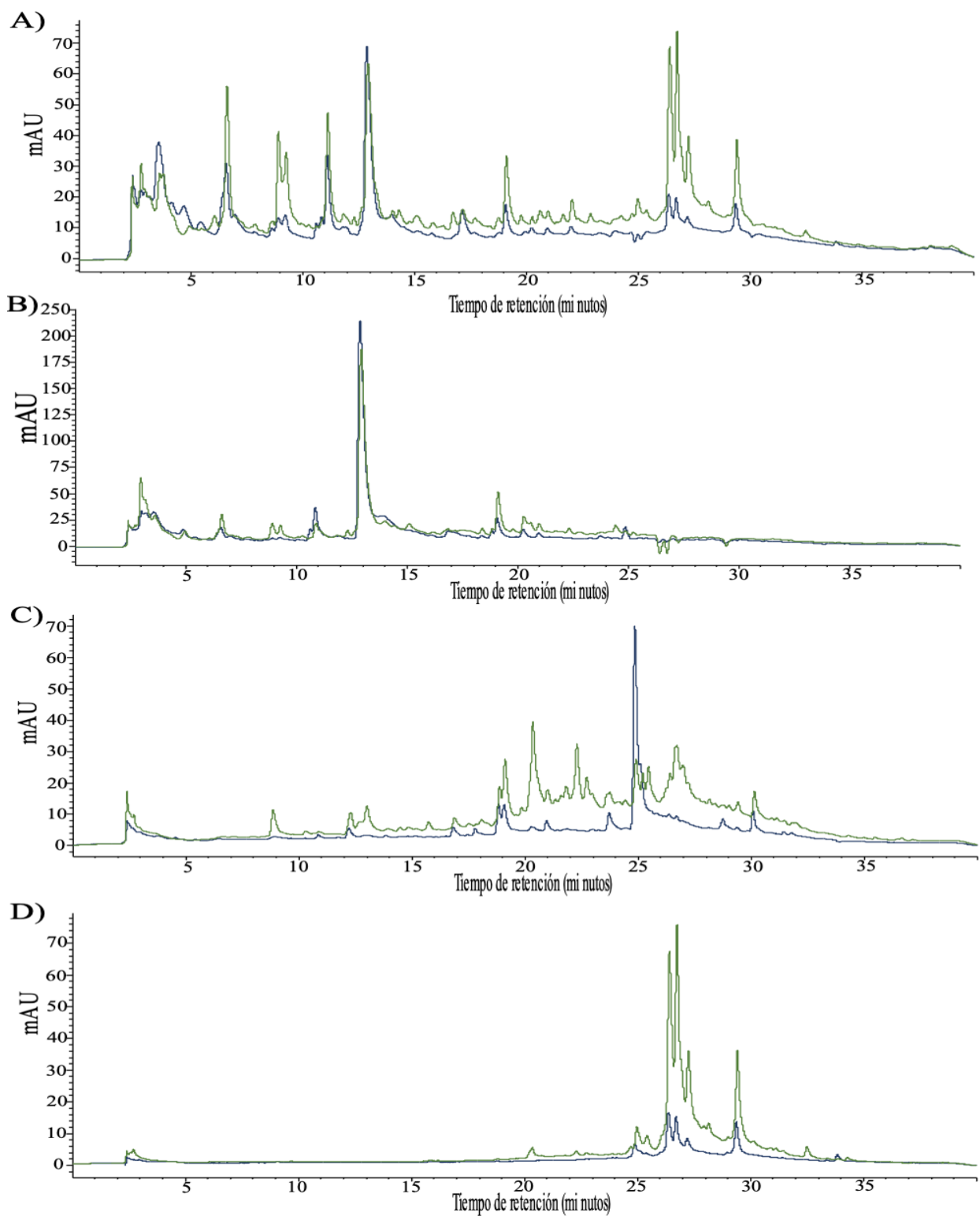
EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (ppm)
<b>OFIa</b>	$3929.86 \pm 159.11$ *
<b>OFIm</b>	$2436.81 \pm 287.42$

### 8.2 Obtención, cuantificación y caracterización por espectrometría de masas [LC/MCD-TOF] de los compuestos fenólicos presentes en OFI por dos métodos de extracción.

Se llevó a cabo la extracción a través del uso de dos solventes, hidrólisis alcalina y extracción metanólica. Posteriormente se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos presentes a las siguientes longitudes de onda: 255, 280, 320, 265, 480 y 535 nm., longitudes de onda en las que los polifenoles se excitan y emiten absorbancia. A las longitudes de onda de 480 y 535 nm, no se observó la presencia de señales.

En la Figura 9 A, se observa el cromatograma a 255 nm, longitud de onda a la que se identificó la presencia de un derivado del ácido protocatechico, a través de espectrometría de masas [LC-MSD/TOF], en concentraciones  $80.82 \pm 0.90$  µg/g harina, para ambos tipos de extracciones. En la figura 9 B, se observa el cromatograma a 280 nm de ambos extractos, de los cuales se logró la identificación del ácido psídico, en concentraciones de  $34.89 \pm 0.99$  µg/g de harina, para ambos tipos de extracciones, representado en la Tabla 4.

En la figura 9 C, se observan los polifenoles detectados a 320 nm, en donde se detectó la presencia ácido ferúlico glicosilado al minuto 20.35 en concentraciones de  $38.78 \pm 2.47$  ug/g de harina, para la extracción metanólica. De igual manera, al minuto 22.28 se detectó otro compuesto de ácido ferúlico glicosilado, en concentraciones de  $23.14 \pm 4.16$  ug/g de harina para el extracto metanólico. Es importante mencionar, que la presencia de estos compuestos por extracción alcalina no fue cuantificable. Al minuto 24.85 se detecta la presencia de derivado de ácido protocatechuico, en concentraciones de  $135.06 \pm 6.09$  ug/g de harina para la extracción alcalina, y de  $15.32 \pm 0.25$  ug/g de harina para la extracción metanólica. Estos resultados se pueden observar de manera detallada en la Tabla 4. Finalmente, en la figura 9 D, se observan los cromatogramas a 365 nm, en donde los polifenoles encontrados predominaron en mayor cantidad al utilizar el método de extracción metanólica. De los polifenoles encontrados a 365 nm, se logró la identificar la presencia de glicósidos de isorhamnetina: Isorhamnetin-glucosil-rhamnosil-rhamnosido al minuto 27.63, Isorhamnetin- glucosil-rhamnosil-pentosido al minuto 28.1, Isorhamnetin-glucosil- rhamnosido, al minuto 28.66 e Isorhamnetin-glucosil-pentosido al minuto 30.63, a través de espectrometría de masas [LC-MSD/TOF]. De todos los glicósidos de isorhamnetina detectados en ambos tipos de extracción, se obtuvo una mayor tasa de rendimiento por medio del extracto metanólico, en comparación con el extracto alcalino, como se observa en la Tabla 4.



**Figura 9.** Perfil de cromatografía líquida de alta resolución de los extractos alcalino (azul) y metanólico (verde) de *Opuntia ficus-indica* a diferentes longitudes de onda. Panel A) 255 nm; Panel B) 280 nm; Panel C) 320 nm; Panel D) 365 nm

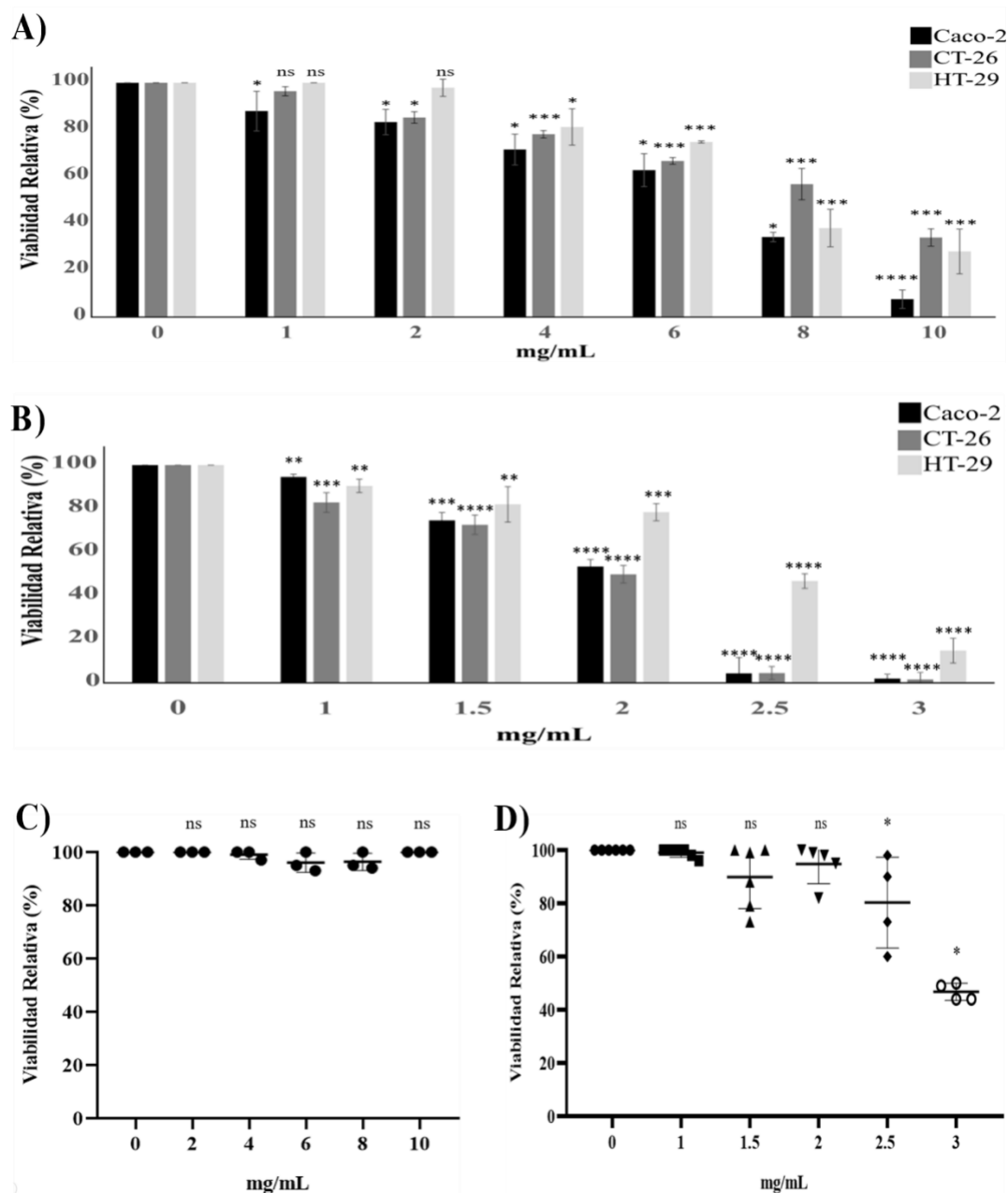
**Tabla 4.** Cuantificación e identificación de los polifenoles presentes en ambos extractos de OFI.

N° Pico	Tiempo de Retención (minutos)	UV max (nm)	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Identificación tentativa del compuesto	Concentración (µg/g harina)	
					Extracto Alcalino	Extracto Metanólico
1	6.59	262	498	Derivado del ácido protocatechuico	80.82 ± 0.90	80.82 ± 0.90
2	8.93	258		Ácido psídico	34.89 ± 0.99	34.89 ± 0.99
3	9.27	252		No identificado	53.43 ± 0.50	53.43 ± 0.50
4	11.33	249	498	No identificado	50.18 ± 0.75	50.18 ± 0.75
5	12.87	222, 274		No identificado	185.81 ± 1.74	185.81 ± 1.74
6	20.35	223, 281, 327		Ácido ferulico glicosilado	-	38.78 ± 2.47
7	22.28	216, 299, 325	498	Ácido ferulico glicosilado	-	23.14 ± 4.16
8	24.85	216, 236, 297, 324		Derivado del ácido protocatechuico	135.06 ± 6.09	15.32 ± 0.25
9	27.62	253, 353	771	Isorhamnetin-glucosil- rhamnosil-rhamnosido	138.15 ± 0.33	247.24 ± 24.17
10	28.1	253, 354	757	Isorhamnetin-glucosil- rhamnosil-pentosido	155.49 ± 5.14	283.01 ± 30.20
11	28.66	253, 353	611	Isorhamnetin-glucosil- rhamnosido	94.13 ± 8.27	113.53 ± 12.74
12	30.62	254, 354	625	Isorhamnetin-glucosil- pentosido	67.9 ± 1.09	108.34 ± 16.33



*8.3 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen perdida de la viabilidad celular en Caco-2, CT-26 y HT-29 sin afectar a PBMC.*

Una vez obtenida la caracterización total de los compuestos fenólicos presentes en ambos tipos de extracción, se procedió a evaluar el efecto citotóxico de los mismos sobre células de cáncer de colon por ensayos de MTT. Se observó una reducción en la actividad metabólica de Caco-2, obteniendo a las 24 horas de tratamiento una  $IC_{50}$  aproximada de 6 mg/mL de OFIa y 2 mg/mL de OFIm, mientras que para la línea celular CT-26 la  $IC_{50}$  fue de 8 mg/mL de OFIa y 2 mg/mL de OFIm, finalmente la  $IC_{50}$  aproximada para HT-29 de 9 mg/mL de OFIa y 2.5 mg/mL de OFIm (Figura 10 A y 10 B, respectivamente). Estos resultados indican que la actividad citotóxica de los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI es dependiente de la concentración y que el extracto metanólico es más citotóxico a menores concentraciones, finalmente se observó una mayor sensibilidad de la línea celular Caco-2 a ambos tratamientos.

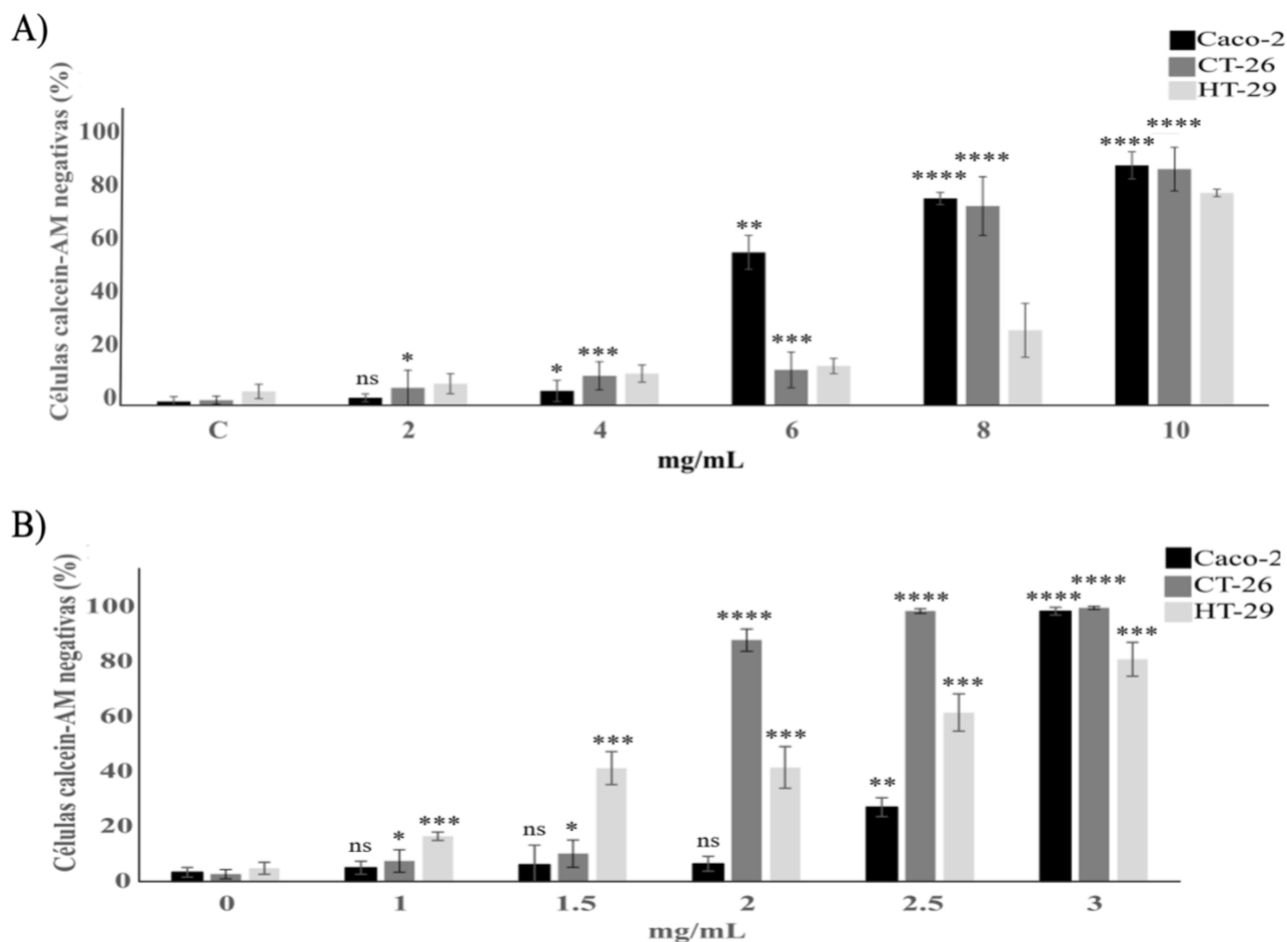


**Figura 10.** El tratamiento con OFIa y OFIm reduce la viabilidad celular en líneas CRC y PBMCs. Las líneas de CRC: Caco-2 (negra), CT-26 (gris oscuro) y HT-29 (gris claro), y PBMCs tratadas con diferentes concentraciones de ambos extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI durante 24 h. Determinación por MTT de: (A) la viabilidad celular relativa de CRC con los tratamientos de OFIa; (B) viabilidad celular relativa de CRC con los tratamiento de OFIm; (C) viabilidad celular relativa de PBMCs con los tratamientos de OFIa, y (D) viabilidad celular relativa de PBMCs con los tratamientos de OFIm, considerando la absorbancia en el control como el 100%. Los datos representan el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  DE. (ns: no significativo; \*:  $p=0.05$ ; \*\*:  $p= < 0,01$ ; \*\*\*:  $< 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p= <0.0001$ ).

Una vez determinada la actividad citotóxica de ambos extractos en líneas de CRC, se procedió a evaluar si esta es específica de células tumorales o si esta afecta a células sanas. Por lo tanto, se realizaron ensayos de MTT en PBMCs obtenidas de donantes sanos, y estas se trataron a las mismas concentraciones que las líneas tumorales durante 24 h.

Las PBMCs tratadas por 24 h a diferentes concentraciones de OFIa no mostraron una pérdida de viabilidad significativa en comparación al control, confirmando la especificidad del tratamiento hacia las células tumorales (Figura 10 C). Por otra parte, las PBMCs tratadas con OFIm no mostró una disminución en la viabilidad dentro del rango en que induce citotoxicidad en células tumorales, sin embargo, a partir de 2.5 mg/mL se obtuvo una pérdida significativa de viabilidad, aproximadamente del 40% (Figura 10 D).

Una vez determinado que los extractos ricos en polifenoles inducían pérdida de viabilidad relativa en células tumorales y no en PBMC, se decidió evaluar por citometría de flujo, en células individuales, si los tratamientos con ambos extractos disminuían la actividad de las esterasas intracelulares, a distintas concentraciones de tratamiento por 24 h en células de cáncer de colon. Los resultados observados para los tratamientos con OFIm fueron: una  $IC_{50}$  aproximada para Caco-2 y HT-29 de 2.5 mg/mL, y para CT-26 de 1.75 mg/mL (Figura 11 A). Siendo CT-26 la línea con mayor sensibilidad al tratamiento con OFIm. Por otra parte, la  $IC_{50}$  encontrada en la línea celular Caco-2 tratada con OFIm fue de 6 mg/mL, mientras que para CT-26 y HT-29 fue de aproximadamente 8 mg/mL. Siendo Caco-2 la línea con mayor sensibilidad al tratamiento con OFIa (Figura 11 B).

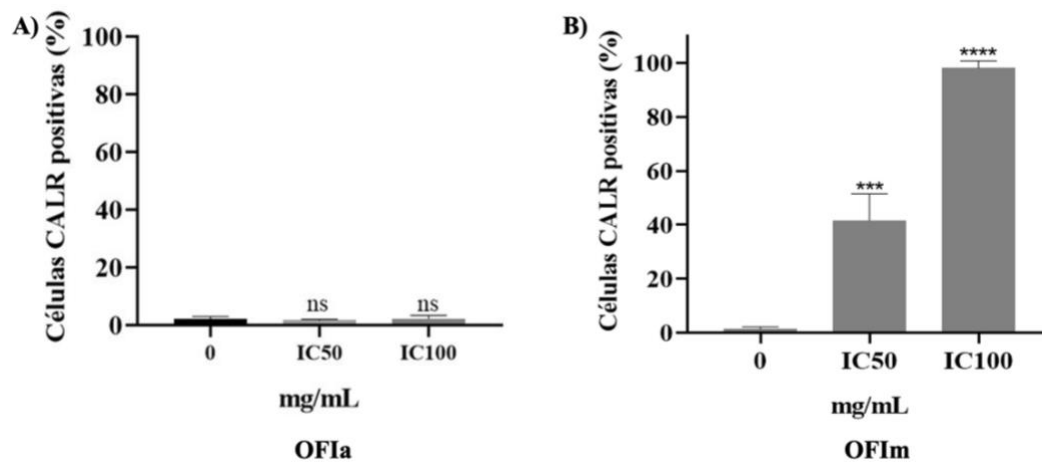


**Figura 11.** El tratamiento con OFIa y OFIm reduce la viabilidad celular en líneas CRC. Las líneas de CRC: Caco-2 (negra), CT-26 (gris oscuro) y HT-29 (gris claro) tratadas con diferentes concentraciones de ambos extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI durante 24 h. Evaluación de la actividad esterasa intracelular por ensayos de Calcein-AM por citometría de flujo de: (A) CRC con los tratamientos de OFIa; (B) CRC con los tratamientos de OFIm. Los datos representan el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$  DE. (ns: no significativo; \*:  $p=0.05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

#### 8.4 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen exposición de CALR en la línea celular CT-26.

Una de las principales características de la ICD es la liberación de DAMPs, siendo la CALR el principal DAMP involucrado en la inmunogenicidad de la muerte. Es por lo mencionado anteriormente que se evaluó la exposición de CALR en la línea celular murina de CRC, CT-26, debido a que es la línea que se utilizara para el *in vivo*, tratadas al IC<sub>50</sub> e IC<sub>100</sub> de ambos extractos. Para lo mencionado anteriormente, se marcaron a las células tratadas con OFIa / OFIm con un anticuerpo anti-CALR y posteriormente se añadió un anticuerpo secundario marcado con ficoeritrina (PE) y se analizó la exposición por citometría de flujo.

En la Figura 5 se muestra que las células CT-26 tratadas con ambos extractos de OFI. En el panel A, se observa el tratamiento con OFIa, en las cuales no se ve un aumento en las células positivas para CALR. Por otra parte, en el panel B, se presentan las células tratadas con OFIm, las cuales presentan marcaje positivo para CALR en comparación al control, y un aumento conforme la dosis.

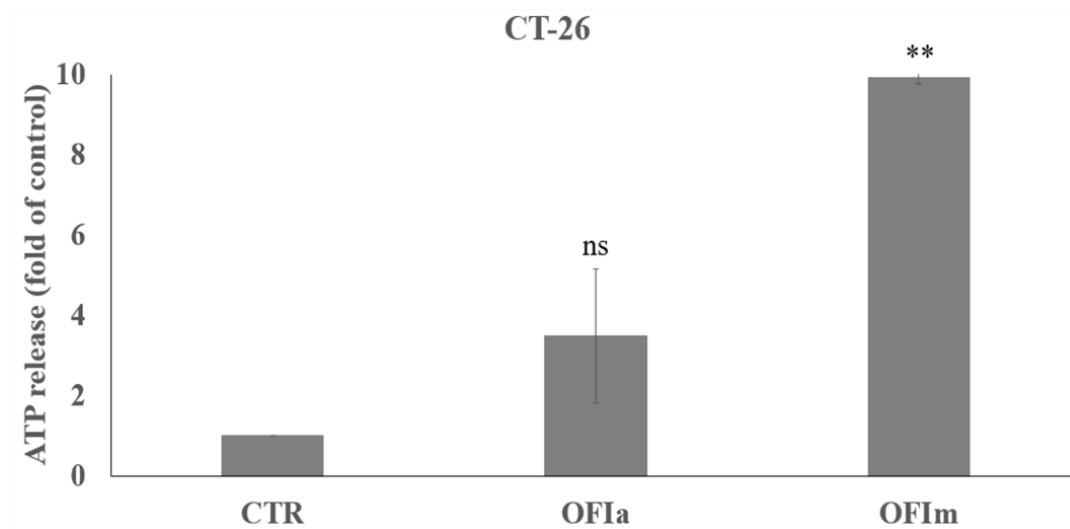


**Figura 12.** Exposición de CALR en CRC después del tratamiento con el IC<sub>50</sub> e IC<sub>100</sub> de OFIa y OFIm. Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo después del marcaje con CALR-PE en células CT-26 tratadas con IC<sub>50</sub> e IC<sub>100</sub> de: A) OFIa; B) OFIm durante 24 horas. Las gráficas de lado derecho representan el promedio de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  DE, analizados por triplicado. (ns: no significativo; \*:  $p=0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

### 8.5 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen liberación de ATP en la línea celular CT-26

Otro DAMP involucrado en la inmunogenicidad de la muerte es el ATP, el cual, al ser liberado por la célula moribunda actúa como señal “encuéntrame” para las células presentadoras de antígeno (Garg, et al., 2015). En este sentido, se procedió a evaluar la liberación de ATP en los sobrenadantes de CT-26 tratadas con el IC<sub>50</sub> de OFIa/OFI<sub>m</sub>.

En la Figura 6, se observa la línea celular CT-26 tratadas con OFIa y OFI<sub>m</sub>, en donde no hubo una diferencia significativa para el tratamiento con OFIa pero si con OFI<sub>m</sub>, en comparación al control.

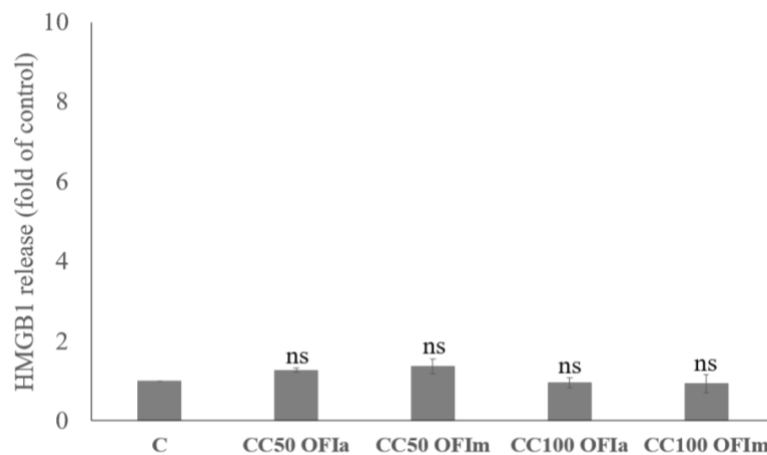


**Figura 13.** El tratamiento con el IC<sub>50</sub> de OFIa y OFI<sub>m</sub> induce la liberación de ATP en CRC. La línea celular CT-26 tratadas con el IC<sub>50</sub> de OFIa y de OFI<sub>m</sub> inducen la liberación de ATP. Las gráficas representan el promedio de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  DE, analizados por triplicado. (ns: no significativo; \*:  $p=0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ ; \*\*\*\*:  $p<0.0001$ ).

*8.6 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI no inducen liberación de HMGB1 en la línea celular CT-26.*

HMGB1 es una molécula ubicada en el núcleo de las células, pero en ciertos casos de muerte celular inmunogénica este puede liberarse al medio extracelular para después unirse a los TLR de las células presentadoras de antígeno y participar en su maduración (Garg, et al., 2015). Por lo tanto, se procedió a evaluar la presencia de HMGB1 en los sobrenadantes de las células tratadas con el IC<sub>50</sub> e IC<sub>100</sub> de OFIa y OFIm.

En la Figura 14, se observa la línea celular CT-26 tratada con OFIa y con OFIm, en donde no se detectó una diferencia de las células tratadas con ambos extractos, en comparación al control.

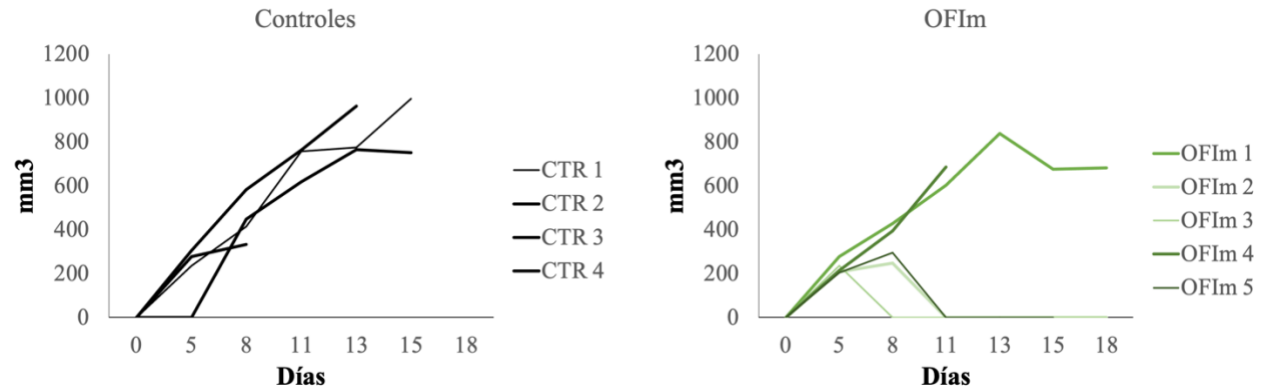


**Figura 14.** El tratamiento con el IC<sub>50</sub> e IC<sub>100</sub> de OFIa y OFIm no induce la liberación de HMGB1 en CRC. La línea celular CT-26 tratadas con el IC<sub>50</sub> de OFIa y de OFIm inducen la liberación de HMGB1. Las gráficas representan el promedio de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  DE, analizados por triplicado. (ns: no significativo; \*:  $p=0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

### 8.7 La vacunación profiláctica de células muertas con OFIm previene el establecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c.

Finalmente, se procedió a evaluar la inmunogenicidad de la muerte tras la aplicación de una vacuna profiláctica de las células CT-26 tratadas con el extracto metanólico de OFI, en ratones macho de la cepa Balb/c ( $n = 5$ ). Se inocularon células muertas con OFIm al día -7. Posteriormente, al día 0 se retaron a los ratones con células CT-26 viables. Cinco días *post*-inoculación comenzó a observarse tumor en los controles y grupos tratados. Las mediciones se comenzaron a tomar a partir del día 5, y los seguimientos se realizaron cada 3 días.

Como se observa en la Figura 12, los ratones control presentaron un crecimiento tumoral de forma gradual a partir del día 5, por lo que a 2 de los ratones de este grupo se les tuvo que sacrificar antes de finalizar el ensayo. Por otra parte, de los ratones con la vacunación profiláctica de OFI, solo 3 presentaron crecimiento tumoral, los otros 4 presentaron ligera inflamación en la zona de inoculación, la cual disminuyó conforme a los días. Reportándose una sobrevida del 60%.



**Figura 15.** OFIm induce memoria inmunológica a corto plazo a través de la vacunación profiláctica. Los gráficos indican el crecimiento tumoral en ratones no vacunados (control;  $n = 4$ ) o vacunados con  $1,5 \times 10^6$  (1,5 M;  $n = 5$ ), células CT-26 tratadas con IC<sub>100</sub> OFIm y reexpuestas con  $1.5 \times 10^6$  células CT-26 viables. Se muestra el promedio de los grupos.



## 9. DISCUSIÓN

Los polifenoles son moléculas antioxidantes que se encuentran de forma natural en las plantas y se encargan de brindar protección en situaciones de estrés y de peligro. A lo largo del tiempo, estas moléculas se han convertido en objetos de interés en el área de la medicina al reportarse su uso desde épocas ancestrales para el tratamiento de enfermedades, incluidas el cáncer. Sin embargo, se han clasificado mas de 100 diferentes tipos de polifenoles con características diferentes, de los cuales, aquellos que han sido estudiados presentan actividad biológica diferente dependiendo de la estructura química que los conforma, las características fisicoquímicas de la planta de la cual se obtuvo y el método de extracción utilizado (Ren-Lin et al, 2019). En este contexto, nuestro grupo de investigación previamente indagó en los compuestos fenólicos presentes en plantas endémicas mexicanas, como *Opuntia ficus-indica*, y demostró que los polifenoles presentes en dicha planta brindan actividades inmunomoduladoras además de inducir muerte celular regulada en diferentes líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HT-29 (Rodríguez-Rodríguez et al, 2015; Antunes-Ricardo et al., 2014, Antunes-Ricardo et al, 2017; Antunes-Ricardo et al, 2019). Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento sobre la actividad anti-tumoral de dichas moléculas.

Es por lo mencionado anteriormente, que se decidió identificar, cuantificar y caracterizar los diferentes polifenoles presentes en OFI obtenidos por el método de liquido-solvente, utilizando dos solventes comúnmente utilizados, hidróxido de sodio (hidrólisis alcalina; OFIa) y metanol (OFIm).

### *9.1 Cuantificación de fenoles totales presentes en los dos extractos ricos en polifenoles de OFI a través del método Folin-Ciocalteu.*

El método Folin-Ciocalteu es comúnmente utilizado para determinar polifenoles presentes en extractos, cuyo mecanismo básico es una reacción de oxidación/reducción (G-biosciences, 2018). Los resultados del ensayo realizado en ambos extractos reportaron una mayor cantidad de polifenoles presentes en el extracto alcalino, en comparación con el extracto metanólico, como se observa en la Tabla 3. La variación en los rendimientos de los extractos se atribuye a las diferentes polaridades de los disolventes utilizados para la extracción (Santos-Zea, 2011;El-Mostafa et al., 2014) en este sentido, se esperaba obtener un rendimiento mayor en la extracción metanólica. Sin

embargo, estos resultados podrían deberse a las características del método utilizado y a los polifenoles que predominan en OFI.

La extracción alcalina se utiliza principalmente para la obtención de polifenoles con azúcares en su estructura, debido a que el hidróxido de sodio va dirigido a romper enlaces glicosídicos, y el cambio de pH, realizado durante la extracción, permite estabilidad a los compuestos (Nardini et al., 2002; Scalbert et al., 1985). Además, se ha reportado que el método utilizado no es específico para grupos fenoles, por lo que otros compuestos presentes en los extractos, como azúcares y aminoácidos, podrían ser reducidos también (Sánchez-Rangel et al., 2013).

## *9.2, Cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos presentes en OFI por dos métodos de extracción.*

Previamente se describió que los polifenoles, identificados por HPLC-DAD a 365 nm, con mayor presencia en OFI por ambos métodos de extracción, era la isorhamnetina con diferentes tipos de glicosilaciones: mono-, di- y tri- (Santos-Zea, 2011), sin embargo, fue hasta el desarrollo de este proyecto de tesis que se hizo un *screening* general a las diferentes longitudes de onda en las que se detectan los polifenoles: 280, 320, 365, 480 y 535, y se observó que al realizar la extracción metanólica se obtiene un mayor rendimiento de los polifenoles presentes a todas las longitudes de onda. Si bien, este resultado no se puede comparar en su totalidad con lo reportado previamente, diversos autores han reportado una mayor efectividad para la obtención de moléculas con grupos fenólicos como la quercetina o el kaempferol al utilizar solventes como el metanol y/o etanol (Kunz, Wenzel & Daniel, 1999; Liu, et al., 2012; Londoño-Londoño, et al., 2016).

Se reportó la presencia de ácido psídico en los extractos de OFI, sin embargo, este predominó en el extracto alcalino. La causa de esto se podría deber a las características de la extracción; al no tener restos de azúcar en su estructura química, ya la alta afinidad con los solventes. La presencia de este compuesto en extractos ricos en polifenoles presentes en OFI se había reportado previamente por García-Cayuela et al. (2019).

### *9.3 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen pérdida de la viabilidad celular en Caco-2, CT-26 y HT-29.*

Una vez obtenidos ambos extractos, se procedió a evaluar el potencial citotóxico por ensayos de MTT y Calcein-AM en las 3 líneas de cáncer de colon: Caco-2, CT-26 y HT-29, así como en PBMCs de donantes sanos. Es importante mencionar que en este proyecto se evaluó por primera vez el efecto citotóxico de ambos extractos en la línea de cáncer de colon murina CT-26. Primeramente, se encontraron  $IC_{50}$  diferentes para cada línea tratadas con OFIa: 6, 8 y 7 mg/mL, respectivamente, y de OFIm: 2, 2 y 2.5 mg/mL, respectivamente. Las diferencias en las  $IC_{50}$  entre extractos podrían deberse a la mayor cantidad de moléculas presentes en el extracto metanólico, las cuales, se estima, son las encargadas de la muerte celular, y que, al encontrarse en menor cantidad en la extracción alcalina, sea necesaria una mayor cantidad de tratamiento para que puedan ejercer su efecto citotóxico. Además, ninguna de las concentraciones reportadas para Caco-2 y HT-29 coinciden con las previamente reportadas (Antunes-Ricardo, et al., 2014; Antunes-Ricardo et al., 2019), lo cual se puede atribuir a los cambios en el método de extracción realizados. Comparado con la preparación previa de OFIm, durante el proceso de extracción las muestras se fraccionaron en columnas de fase sólida con el objetivo de tener un extracto rico en compuestos polares, previo a ser secado y liofilizado, proceso no realizado durante la elaboración del extracto de OFIm utilizado para ensayos de muerte celular en líneas de cáncer de colon previamente (Antunes-Ricardo et al., 2014; Antunes-Ricardo et al., 2019). Contrario a lo reportado previamente, nuestro equipo de investigación concluyó que el extracto metanólico es más citotóxico en líneas tumorales, sin dañar la viabilidad de células sanas. Dicha efectividad se puede atribuir a la afinidad dada por la polaridad de los solventes, en este caso metanol, con los grupos fenoles presentes en OFI.

### *9.4 Los tratamientos con los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI inducen la liberación y exposición de DAMPs.*

La muerte celular inmunogénica se propone como una alternativa para reactivar la respuesta inmune anti-tumoral, esto tras la emisión de DAMPs, los cuales aumentan la inmunogenicidad de las células en proceso de muerte (Kepp et al., 2014). En este sentido, una vez confirmado el efecto citotóxico de ambos extractos, se procedió a evaluar la liberación de CALR, ATP y HMGB1,

principales DAMPs involucrados en la MCI y cáncer (Galluzi et al., 2018), en la línea celular de cáncer de colon murino CT-26.

El primer DAMP evaluado fue la exposición de CALR, el cual es un DAMP que participa en la maduración de células dendríticas y presentación de antígeno. Previamente se ha reportado que el tratamiento con polifenoles, como la Shikonina y la Hipericina, en diferentes modelos de cáncer de colon, induce la liberación de CALR tras generar un estrés al retículo endoplasmático (Garg et al., 2013; Verfaillie et al., 2013; Garg et al., 2016; Che, et al., 2012; Yin et al., 2016). En este estudio, se demostró que el extracto metanólico de OFI es capaz de inducir la exposición de CALR, en la línea CT-26, pero no el extracto alcalino. La diferencia en la exposición de CALR es atribuida a las diferencias entre los compuestos encontrados en los métodos de extracción, atribuyéndole el potencial inmunológico a alguno de los polifenoles presentes de forma exclusiva en el extracto metanólico. En este sentido y con base en las características las extracciones previamente descritas, se podría inferir en que los polifenoles sin moléculas añadidas a su estructura podrían ser las efectoras de este mecanismo de muerte.

Posteriormente, procedimos a evaluar la liberación de ATP, DAMP que es reconocido por receptores purinérgicos (P2Y2 y P2X7), y participan en la migración de células fagocíticas, y liberación de citocinas para promover la respuesta anti-tumoral específicas de antígeno (Chiba et al., 2012; Galluzi et al., 2018). Los resultados obtenidos fueron similares a los observados con CALR; las células tratadas con el extracto metanólico inducen la liberación de ATP, pero no el extracto alcalino. Similar a lo mencionado previamente, estas diferencias son atribuidas a alguno de los polifenoles presentes de forma exclusiva en el extracto metanólico. Sin embargo, al observarse una mayor cantidad en comparación al control, podría especularse que otro polifenol presente en ambos extractos, pero en mayor cantidad en el extracto metanólico, participa en la liberación del ATP. Los resultados obtenidos son similares a los previamente realizados con extractos metanólicos provenientes de otras plantas como inductores de MCI, como el Waoning como tratamiento en cáncer gástrico (Yang et al., 2012).

Finalmente, se evaluó la liberación de HMGB1, una proteína que, en procesos de MCI, este DAMP es liberado y se une a TLR4 de las células dendríticas, promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias, participando en la presentación de antígeno y suprimiendo la actividad de los

linfocitos T reguladores ( $T_{reg}$ ) (Kroemer et al., 2013; Zhu et al, 2011). Sin embargo, no se observó una liberación bajo el tratamiento de ninguno de los dos extractos. A pesar de este hallazgo, estudios previos han reportado que no es necesaria la liberación de todos los DAMPs para la efectividad de MCI. Por lo tanto, es necesario indagar en la inmunogenicidad de la muerte en modelos *in vivo*.

#### *9.5 La vacunación profiláctica de células muertas con OFIm previene el establecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c.*

Debido a que la evaluación *in vitro* de las características de la MCI no es suficientes para asegurar la efectividad de esta, se procedió a evaluar la efectividad *in vivo* a través del estándar de oro de la muerte inmunogénica a través de la vacunación profiláctica con células muertas con el extracto (Tesniere et al., 2007). Para este ensayo se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c, debido a que el estrógeno tiene un rol protector para la aparición de cáncer de colon (Keum et al., 2019). Posterior a la inoculación de las células muertas con el tratamiento, se retó al ratón con células CT-26 viables. Los resultados mostraron que la vacunación profiláctica con el extracto metanólico de OFI podría prevenir el establecimiento tumoral, en comparación al grupo control, reportándose una sobrevida del 60%. Esto se debe a que, posiblemente, dentro del extracto con las células, se encontraban DAMPs, los cuales fueron reconocidos por las células del sistema inmune y se montó una presentación de antígeno, permitiendo el desarrollo de una memoria inmunológica a corto plazo (Tesniere et al., 2007). Sin embargo, es necesario repetir el experimento y aumentar la n.

Además del porcentaje de ratones libres de tumor, para considerar a un tratamiento como inductor de MCI, se toma en cuenta la tasa de crecimiento de los tumores que se desarrollan a pesar de la respuesta inmune adaptativa inducida por la vacuna, sirve como indicador de, al menos, cierto grado de inmunogenicidad (Galluzzi et al., 2020). En este sentido, se resalta la efectividad de la vacunación profiláctica con el extracto metanólico de OFI, debido que, a pesar de los ratones con crecimiento tumoral, este fue más lento en comparación al control.

Es importante mencionar, que este resultado destaca el potencial de los polifenoles como posibles inductores de muerte celular inmunogénica, debido a que, la mayoría de los estudios en donde se investiga la inmunogenicidad de la muerte inducida por extractos ricos en polifenoles, o polifenoles aislados, se evalúan únicamente de manera *in vitro*, sin considerar el efecto de estos

compuestos en células no cancerosas, así como su efectividad en modelos *ex vivo* e *in vivo*. Además, para aquellos extractos cuya efectividad se ha confirmado *in vivo*, su aplicación es como adyuvante a terapias actuales. Destacando, aún más, el potencial de los polifenoles de OFI como inductores de MCI.

## 10. CONCLUSION.

1. El método de extracción más efectivo para la obtención de polifenoles presentes en OFI es por medio de extracción metanólica.
2. La citotoxicidad inducida por los extractos ricos en polifenoles provenientes de OFI son específicas de células tumorales, así mismo, las concentraciones varían dependiendo del método utilizado y dependientes de la línea celular.
3. Se requiere menos concentración de OFIm para inducir citotoxicidad en CRC.
4. La exposición de calreticulina y liberación de ATP es dependiente del método de extracción utilizado para la obtención de los compuestos fenólicos.
5. Los OFIa ni OFIm no inducen la liberación de HMGB1 en células de cáncer de colon.
5. La vacunación profiláctica con el extracto metanólico rico en polifenoles presentes en OFI pareciera prevenir el establecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c, en un modelo de cáncer de colon.

## 11. PERSPECTIVAS.

- Diseñar un proceso de extracción “verde” dirigidos a obtener compuestos fenólicos específicos, presentes en OFI.
- Identificar los polifenoles efectores de la citotoxicidad en CRC.
- Describir las características bioquímicas de la muerte inducida por los polifenoles presentes en el extracto metanólico de OFI en CRC.
- Evaluar el potencial profiláctico y terapéutico de la vacunación con los polifenoles provenientes del extracto metanólico de OFI en un modelo murino inmunocompetente e inmunodeficiente.
- Determinar si los polifenoles inductores de la muerte tienen potencial inmunomodulador en un modelo in vitro e in vivo.
- Evaluar el potencial inmunomodulador de los polifenoles presentes en OFI.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Al Juhaimi, F., Özcan, M. M., Uslu, N., Ghafoor, K., & Babiker, E. E. (2018). Effect of microwave heating on phenolic compounds of prickly pear ( *Opuntia ficus-indica* L.) seeds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), 13437. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13437>
- Ameer, K., Shahbaz, H., & Kwon, J. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 16(2), 295-315. doi: 10.1111/1541-4337.12253
- Ammar, I., Ennouri, M., & Attia, H. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Industrial Crops And Products*, 64, 97-104. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.11.030
- Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J., López-Pacheco, F., Alvarez, M., & Serna-Saldívar, S. (2015). In vivo anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Industrial Crops And Products*, 76, 803-808. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.089
- Antunes-Ricardo, M., Hernández-Reyes, A., Uscanga-Palomeque, A., Rodríguez-Padilla, C., Martínez-Torres, A., & Gutiérrez-Urbe, J. (2019). Isorhamnetin glycoside isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill induces apoptosis in human colon cancer cells through mitochondrial damage. *Chemico-Biological Interactions*, 310, 108734. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108734
- Antunes-Ricardo, M., Moreno-García, B., Gutiérrez-Urbe, J., Aráiz-Hernández, D., Alvarez, M., & Serna-Saldívar, S. (2014). Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells Treated with Isorhamnetin Glycosides from *Opuntia Ficus-indica* Pads. *Plant Foods For Human Nutrition*, 69(4), 331-336. doi: 10.1007/s11130-014-0438-5
- Antunes-Ricardo, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Gutiérrez-Urbe, J., Cepeda-Cañedo, E., & Serna-Saldívar, S. (2017). Bioaccessibility, Intestinal Permeability and Plasma Stability of Isorhamnetin Glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.). *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(8), 1816. doi: 10.3390/ijms18081816
- Aragona, M., Lauriano, E., Pergolizzi, S., & Faggio, C. (2017). *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Natural Product Research*, 32(17), 2037-2049. doi: 10.1080/14786419.2017.1365073

Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(3-4), 325-331. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.04.001

Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3063-3073. doi: 10.2174/138161209789058084

Bartnik, M., & Facey, P. (2017). Glycosides. Retrieved 6 August 2019, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000081>

Basic Information About Colorectal Cancer | CDC. (2020). Retrieved 2 December 2020, from [https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic\\_info/index.htm](https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/index.htm)

Belhadj Slimen, I. (2016). *Opuntia ficus-indica* as a Source of Bioactive and Nutritional Phytochemicals. *Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 4(6), 162. doi: 10.11648/j.jfns.20160406.14

Boas, F., Bodei, L., & Sofocleous, C. (2017). Radioembolization of Colorectal Liver Metastases: Indications, Technique, and Outcomes. *Journal Of Nuclear Medicine*, 58(Supplement 2), 104S-111S. doi: 10.2967/jnumed.116.187229

Calderón-Montaña, J. M., Burgos-Morón, E., Orta, M. L., Maldonado-Navas, D., García-Domínguez, I., & López-Lázaro, M. (2014). Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. *BioMed research international*, 2014, 794930. <https://doi.org/10.1155/2014/794930>

Cáncer colorrectal. (2019). Retrieved 22 July 2019, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal>

Cao, K., Tait, S., Xu, C., Wang, X., Zhou, Y., & Chen, F. et al. (2019). Cell death - Latest research and news | Nature. Retrieved 17 August 2019, from <https://www.nature.com/subjects/cell-death>

Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>

Cerella, C., Teiten, M. H., Radogna, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2014). From nature to bedside: pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnology advances*, 32(6), 1111–1122. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.006>

- Cheeke, P. (2020). Toxicant of plants origin: Glycosides (2nd ed., pp. 71-87). [S.l.]: CRC PRESS.
- Chen, H., Wang, P., Chen, S., Wen, C., Chen, Y., Yang, W., & Yang, N. (2012). Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(11), 1989-2002. doi: 10.1007/s00262-012-1258-9
- Colorectal Cancer Stages. (2018). Retrieved 17 August 2019, from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *International Journal Of Molecular Sciences*, 14(8), 16365-16385. doi: 10.3390/ijms140816365
- Contreras-Murillo, S., de los Cobos -Silva, S., Morán-Gutiérrez, R., Lara-Velázquez, P., Gutiérrez-Andrade, M., & Rincón-García, E. (2020). MEASUREMENT OF CLADODES OF *Opuntia spp.* IN THREE-DIMENSIONAL PHOTOGRAPHS. *Agrociencias*, 54(2), 177 - 194. Retrieved from <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1900/1897>.
- Danial, N., & Hockenbery, D. (2018). Cell Death. *Hematology*, 186-196. doi: 10.1016/b978-0-323-35762-3.00018-4
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Denny, A., & Buttriss, J. (2007). *Plant foods and health* (4th ed.). Norwich: European Food Information Resource Consortium (EuroFIR).
- Duineveld, L., van Asselt, K., Bemelman, W., Smits, A., Tanis, P., van Weert, H., & Wind, J. (2016). Symptomatic and Asymptomatic Colon Cancer Recurrence: A Multicenter Cohort Study. *The Annals Of Family Medicine*, 14(3), 215-220. doi: 10.1370/afm.1919
- Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Open Chemistry*, 8(2), 243-257. doi: 10.2478/s11532-010-0006-2
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbij, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B. and Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia*

*ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, [online] 19(9), pp.14879-14901. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270776/>.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337

Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., & Spreca, A. et al. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death & Differentiation*, 9(10), 1069-1077. doi: 10.1038/sj.cdd.4401073

FAO. (2018). ECOLOGIA DEL CULTIVO, MANEJO Y USOS DEL NOPAL (pp. 31-40; 45; 134; 156). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Ferguson, L. R., Zhu, S. T., & Harris, P. J. (2005). Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular nutrition & food research*, 49(6), 585–593. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500014>

Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1237-1243. doi: 10.1038/sj.cdd.4402148

Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1237-1243. doi: 10.1038/sj.cdd.4402148

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., & Agostinis, P. et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., & Agostinis, P. et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4

Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., & Martinez, A. et al. (2020). Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. Retrieved, from <https://jitc.bmj.com/content/8/1/e000337>

- Garg, A., Dudek-Peric, A., Romano, E., & Agostinis, P. (2015). Immunogenic cell death. The International Journal Of Developmental Biology, 59(1-2-3), 131-140. doi: 10.1387/ijdb.150061pa
- Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Faulds, C. B., & Waldron, K. W. (2009). Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. Journal of agricultural and food chemistry, 57(21), 10323–10330. <https://doi.org/10.1021/jf9022096>
- Gruber-Rouh, T., Marko, C., Thalhammer, A., Nour-Eldin, N., Langenbach, M., & Beeres, M. et al. (2016). Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases. The British Journal Of Radiology, 89(1064), 20151060. doi: 10.1259/bjr.20151060
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M., Mortensen, A., Laursen, B., & Lin, L. et al. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). Journal Of Food Composition And Analysis, 23(6), 525-532. doi: 10.1016/j.jfca.2009.12.003
- Gul, K., Singh, A. and Jabeen, R. (2015). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, [online] 56(16), pp.2617-2627. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.903384?scroll=top&needAccess=true>
- Hanahan, D., & Coussens, L. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell, 21(3), 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hfaiedh, N., Salah Allagui, M., Hfaiedh, M., El Feki, A., Zourgui, L. & Croute, F. 2008. Protective effect of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladode extract upon nickel–induced toxicity in rats. Food Chem. Toxicol., 46: 3759–3763. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=479503&t=1>
- Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells Treated with Isorhamnetin Glycosides from *Opuntia Ficus-indica* Pads. (2014). Plant Foods Hum Nutr.

International Union of Pure and Applied Chemistry. (2019). Retrieved 6 August 2019, from <https://iupac.org>

Isorhamnetin. (2020). Retrieved 1 July 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281654>

Jones, S., Chen, W., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., & Antal, T. et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(11), 4283-4288. doi: 10.1073/pnas.0712345105

Karunanithi, A., & Venkatachalam, S. (2019). Ultrasonic-assisted solvent extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* peel: Phytochemical identification and comparison with soxhlet extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), 1-10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13126>

Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., & Agostinis, P. et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, 3(9), e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691

Kerr, J., Wyllie, A., & Currie, A. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal Of Cancer*, 26(4), 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33

Kim, J. E., Lee, D. E., Lee, K. W., Son, J. E., Seo, S. K., Li, J., Jung, S. K., Heo, Y. S., Mottamal, M., Bode, A. M., Dong, Z., & Lee, H. J. (2011). Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(4), 582–591. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0032>

Koubaa, M., Mhemdi, H., Barba, F., Angelotti, A., Bouaziz, F., Chaabouni, S., & Vorobiev, E. (2016). Seed oil extraction from red prickly pear using hexane and supercritical CO<sub>2</sub>: assessment of phenolic compound composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 97(2), 613-620. doi: 10.1002/jsfa.7774

Kuipers, E., Grady, W., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J., & Boelens, P. et al. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1). doi: 10.1038/nrdp.2015.65.

Lee, D., Sagar, P., Sadadcharam, G., & Tan, K. (2017). Advances in surgical management for locally recurrent rectal cancer: How far have we come?. *World Journal Of Gastroenterology*, 23(23), 4170. doi: 10.3748/wjg.v23.i23.4170

- Li, L., Wu, K., Lai, H., & Zhang, B. (2017). Clinical Application of CT-Guided Percutaneous Microwave Ablation for the Treatment of Lung Metastasis from Colorectal Cancer. *Gastroenterology Research And Practice*, 2017, 1-9. doi: 10.1155/2017/9621585
- Li, R., Guo, M., Zhang, G., Xu, X., & Li, Q. (2006). Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *Journal of ethnopharmacology*, 107(1), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.024>
- Liu, R. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal Of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S. doi: 10.1093/jn/134.12.3479s}
- Lockhart, C., & Berlin, J. (2005). The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Seminars In Oncology*, 32(1), 52-60. doi: 10.1053/j.seminoncol.2004.09.036
- López-Ávila, V. (2000). Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry [Libro electrónico]. En Chapter 3 Applications of microwave-assisted extraction in environmental analysis (2.a ed., Vol. 21, pp. 1389-1399). Academia Press. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(00\)80009-8](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(00)80009-8)
- Lozano, G., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, Á., & García, J. et al. (2009). Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *Journal Of Reproduction And Development*, 55(6), 615-621. doi: 10.1262/jrd.20250
- Ma, B., Gao, P., Wang, H., Xu, Q., Song, Y., & Huang, X. et al. (2017). What has preoperative radio(chemo)therapy brought to localized rectal cancer patients in terms of perioperative and long-term outcomes over the past decades? A systematic review and meta-analysis based on 41,121 patients. *International Journal Of Cancer*, 141(5), 1052-1065. doi: 10.1002/ijc.30805
- Mazumder, A., Lee, J. Y., Talhi, O., Cerella, C., Chateauvieux, S., Gaigneaux, A., Hong, C. R., Kang, H. J., Lee, Y., Kim, K. W., Kim, D. W., Shin, H. Y., Dicato, M., Bachari, K., Silva, A. M. S., Orlikova-Boyer, B., & Diederich, M. (2018). Hydroxycoumarin OT-55 kills CML cells alone or in synergy with imatinib or Synribo: Involvement of ER stress and DAMP release. *Cancer Letters*, 438, 197-218. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.041>
- Menger, L., Vacchelli, E., Adjemian, S., Martins, I., Ma, Y., Shen, S., Yamazaki, T., Sukkurwala, A. Q., Michaud, M., Mignot, G., Schlemmer, F., Sulpice, E., Locher, C., Gidrol,



X., Ghiringhelli, F., Modjtahedi, N., Galluzzi, L., André, F., Zitvogel, L., Kepp, O., ... Kroemer, G. (2012). Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Science translational medicine*, 4(143), 143ra99. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003807>

Müller, M., Ibrahim, A., & Arends, M. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125-134. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3

Nakayama, M., Aihara, M., Chen, Y. N., Araie, M., Tomita-Yokotani, K., & Iwashina, T. (2011). Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Molecular vision*, 17, 1784–1793.

Nardini, M. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79(1), 119-124. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00213-3)

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 3663, Hypericin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hypericin>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 479503, Shikonin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Shikonin>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. (2017). Retrieved 17 August 2019, from [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx)

Nicholls, R., Zinicola, R., & Haboubi, N. (2017). Extramural spread of rectal cancer and the AJCC Cancer Staging Manual 8th edition, 2017. *Annals Of Oncology*, 30(8), 1394-1395. doi: 10.1093/annonc/mdz147

Ogino, S., & Goel, A. (2008). Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *The Journal Of Molecular Diagnostics*, 10(1), 13-27. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070082

Orlikova, B., Legrand, N., Panning, J., Dicato, M., & Diederich, M. (2013). Anti-Inflammatory and Anticancer Drugs from Nature. *Advances In Nutrition And Cancer*, 123-143. doi: 10.1007/978-3-642-38007-5\_8



- Pan, M., Ghai, G., & Ho, C. (2008). Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 43-52. doi: 10.1002/mnfr.200700380
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A., & Chapman, D. et al. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO Journal*, 28(5), 578-590. doi: 10.1038/emboj.2009.1
- Park, J. S., Lee, H. J., Lee, D. Y., Jo, H. S., Jeong, J. H., Kim, D. H., Nam, D. C., Lee, C. J., & Hwang, S. C. (2015). Chondroprotective Effects of Wogonin in Experimental Models of Osteoarthritis in vitro and in vivo. *Biomolecules & therapeutics*, 23(5), 442-448. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.045>
- Pavlova, N., & Thompson, C. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27-47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Pawaria, S., & Binder, R. (2011). CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nature Communications*, 2(1). doi: 10.1038/ncomms1524
- Polyphenols (Folin Ciocalteu) Assay. (2018). Retrieved from [https://www.gbiosciences.com/image/pdfs/protocol/Polyphenols\\_Assay.pdf](https://www.gbiosciences.com/image/pdfs/protocol/Polyphenols_Assay.pdf)
- Radogna, F., Cerella, C., Gaigneaux, A., Christov, C., Dicato, M., & Diederich, M. (2016). Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma. *Oncogene*, 35(29), 3839-3853. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.455>
- Riley, J., Cross, A., Paulos, C., Rubinstein, M., Wrangle, J., & Camp, E. (2018). The clinical implications of immunogenomics in colorectal cancer: A path for precision medicine. *Cancer*, 124(8), 1650-1659. doi: 10.1002/cncr.31214
- Rodríguez-García, M., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M., Palacios-Fonseca, A., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L., Del-Real, A., Zepeda, T. and Muñoz-Torres, C. (2007). Physicochemical Characterization of Nopal Pads (*Opuntia ficus indica*) and Dry Vacuum Nopal Powders as a Function of the Maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, [online] 62(3), pp.107-112. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674207>.
- Rodríguez-Rodríguez, C., Torres, N., Gutiérrez-Urbe, J., Noriega, L., Torre-Villalvazo, I., & Leal-Díaz, A. et al. (2015). The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-*

*indica* in a mouse model of diet induced obesity. Food & Function, 6(3), 805-815. doi: 10.1039/c4fo01092b

Ronquillo-Moreta, A., & Yugcha-Alomaliza, J. (2019). Diseño y construcción de un prototipo extractor de esencias de plantas aromáticas con fluidos supercríticos. Retrieved 3 December 2020, from <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/11958/2/ESPEL-EMI-0321-P.pdf>

Rösler, H., Rösler, U., Mabry, T. and Kagan, J. (1966). The flavonoid pigments of *Opuntia lindheimeri*. Phytochemistry, [online] 5(1), pp.189-192. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200850980>.

Rothberg, J., Bailey, K., Wojtkowiak, J., Ben-Nun, Y., Bogyo, M., & Weber, E. et al. (2013). Acid-Mediated Tumor Proteolysis: Contribution of Cysteine Cathepsins. Neoplasia, 15(10), 1125-IN9. doi: 10.1593/neo.13946

Saleem, M., Kim, H. J., Han, C. K., Jin, C., & Lee, Y. S. (2006). Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Phytochemistry, 67(13), 1390–1394. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.04.009>

Saleem, M., Kim, H., Han, C., Jin, C., & Lee, Y. (2006). Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Phytochemistry, 67(13), 1390-1394. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.04.009

Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. Analytical Methods, 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>

Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. and Serna-Saldivar, S. (2011). Comparative Analyses of Total Phenols, Antioxidant Activity, and Flavonol Glycoside Profile of Cladode Flours from Different Varieties of *Opuntia spp.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(13), pp.7054-7061.

Scalbert, A. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. Phytochemistry, 24(6), 1359-1362. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)81133-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)81133-4)

Shu-Yi, Y., Ning-Sun, Y., & Tien-Jen, L. (2016). Molecular basis of shikonin-induced immunogenic cell death: insights for developing cancer therapeutics. Receptors & Clinical Investigation, 3. doi: 10.14800/rci.1234

- Singh, M., Rai, S., Pandey, A., Singh, N., & Srivastava, S. (2019). Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*. doi: 10.1016/j.gendis.2019.10.013
- Sjostrom, J. (2001). How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*, 322(7301), 1538-1539. doi: 10.1136/bmj.322.7301.1538
- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C., Végran, F., Verrax, J., & Kennedy, K. et al. (2012). Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis. *Plos ONE*, 7(3), e33418. doi: 10.1371/journal.pone.0033418
- Stern, R., Shuster, S., Neudecker, B., & Formby, B. (2002). Lactate Stimulates Fibroblast Expression of Hyaluronan and CD44: The Warburg Effect Revisited. *Experimental Cell Research*, 276(1), 24-31. doi: 10.1006/excr.2002.5508
- Susin, S., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., & Loeffler, M. et al. (2000). Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *The Journal Of Experimental Medicine*, 192(4), 571-580. doi: 10.1084/jem.192.4.571
- Syn, N., Teng, M., Mok, T., & Soo, R. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology*, 18(12), e731-e741. doi: 10.1016/s1470-2045(17)30607-1
- Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 3-12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>
- Topalian, S., Taube, J., Anders, R., & Pardoll, D. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(5), 275-287. doi: 10.1038/nrc.2016.36
- Tratamiento del cáncer de colon según la etapa. (2020). Retrieved 26 November 2020, from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/por-etapas-colon.html>
- Truong, D.-H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>

- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Fridman, W., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., & Kroemer, G. (2012). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers.
- Valls - Puig, J. (2003). Extracción en fase sólida (SPE) para tratamiento de muestras de alimentos para análisis por cromatografía. Retrieved 27 November 2020, from [https://www.researchgate.net/publication/307633978 Extraccion en fase solida SPE para tratamiento de muestras de alimentos para analisis por cromatografia](https://www.researchgate.net/publication/307633978_Extraccion_en_fase_solida_SPE_para_tratamiento_de_muestras_de_alimentos_para_analisis_por_cromatografia)
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., & Mackie, A. et al. (2015). The impact of food bioactives on gut health (6th ed., pp. 104- 106). Noruega: DOI 10.1007/978-3-319-16104-4.
- Weston, L., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal Of Chemical Ecology*, 39(2), 283-297. doi: 10.1007/s10886-013-0248-5
- Wiese, J., McPherson, S., Odden, M., & Shlipak, M. (2004). Effect of *Opuntia ficus indica* on Symptoms of the Alcohol Hangover. *Archives Of Internal Medicine*, 164(12), 1334. doi: 10.1001/archinte.164.12.1334
- Wright, M., Beaty, J., & Ternent, C. (2017). Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surgical Clinics Of North America*, 97(3), 683-701. doi: 10.1016/j.suc.2017.01.014
- Yang, Y., Li, X. J., Chen, Z., Zhu, X. X., Wang, J., Zhang, L. B., Qiang, L., Ma, Y. J., Li, Z. Y., Guo, Q. L., & You, Q. D. (2012). Wogonin induced calreticulin/annexin A1 exposure dictates the immunogenicity of cancer cells in a PERK/AKT dependent manner. *PloS one*, 7(12), e50811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050811>
- You, B. R., & Park, W. H. (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 24(5), 1356–1362. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.009>
- Zhang, N., Pei, F., Wei, H., Zhang, T., Yang, C., Ma, G., & Yang, C. (2011). Isorhamnetin protects rat ventricular myocytes from ischemia and reperfusion injury. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 63(1-2), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.09.005>

### 13. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

María Norma González Flores.

Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Campo de estudio: Inmunología molecular del cáncer, química orgánica.

Datos personales: Nacida en Linares, Nuevo León el 12 de octubre de 1995, hija de Matías  
González Cárdenas y Norma I. Flores García.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de  
Licenciado en Nutrición en 2018 con mención honorífica.